



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

KAISA RAUTANIEMI
AMORFISEN LÄÄKEAINEEN KITEYTYMISKINETIIKKA ELIN-
AIKAEROTTEISELLA FLUORESENSSIMIKROSKOOPILLA

Diplomityö

Tarkastajat: Akatemiatutkija Timo
Laaksonen ja yliopistonlehtori Elina
Vuorimaa-Laukkanen
Teknis-luonnontieteellisen tiedekunnan
dekaani on hyväksynyt tarkastajat ja
aiheen 4.1.2017

TIIVISTELMÄ

KAISA RAUTANIEMI: Amorfisen lääkeaineen kiteytymiskinetiikka elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla

Tampereen teknillinen yliopisto

Diplomityö, 79 sivua, 2 liitesivua

Toukokuu 2017

Teknis-luonnontieteellinen koulutusohjelma

Pääaine: kemia

Tarkastajat: Akatemiatutkija Timo Laaksonen ja yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkanen

Avainsanat: elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia, kiteytyminen, amorfinen muoto, indometasiini, kineettinen analyysi, terminen analyysi

Tutkimuksessa selvitettiin, miten elinaikaerotteista fluoresenssimikroskopiaa (fluorescence lifetime microscopy, FLM) voidaan käyttää amorfisen lääkeaineen kiteytymisen seuraamisessa. Mallilääkeaineena käytettiin indometasiinia. Indometasiinin muotojen (amorfisen sekä γ - ja α -kiteisen) aikaerotteinen fluoresenssi määritettiin elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla. Tulosten perusteella indometasiinin muotojen fluoresenssin aikariippuvuudet eroavat toisistaan. Amorfisen indometasiinin kiteytymistä seurattiin kymmenen vuorokauden ajan kaksissa säilytysolosuhteissa: 60 °C lämpötilassa 0 % suhteellisessa ilmankosteudessa (relative humidity, RH) ja huoneenlämmössä 100 % RH:ssa. Lämpökaapissa säilytetyt näytteet peittyivät nopeasti kiteisellä kerroksella, jonka läpimitta kasvoi kiteytymisen edetessä. Näytteiden konversioaste voitiin laskea fluoresenssin elinaikojen osuuksista, ja tulosten perusteella diffuusiorajoitetut reaktiomallit kuvasivat kiteytymistä parhaiten. FLM ei soveltunut 100 % RH:ssa huoneenlämmössä säilytettyjen näytteiden kiteytymisen kineettiseen analysointiin. Näytteet kiteytyivät toisistaan melko kaukana olevina tiivisrakenteisina, amorfisen aineen ympäröiminä alueina, jolloin käytetyn FLM-laitteiston skannausala oli liian pieni näytettä edustavan pinta-alan seuraamiseksi. Indometasiinia kiteytettiin myös nopeasti etanolin avulla, jolloin näytettä ei jouduttu siirtämään mittausten välillä ja FLM-kuvien intensiteetit olivat keskenään verrannollisia. Näissä olosuhteissa kiteytymistä voitiin arvioida suuntaa antavasti myös elinaikajakauman muutoksen avulla. Elinaikajakauman hyödyntäminen kineettisessä tarkastelussa vaatii kuitenkin jatkotutkimusta. Menetelmään liittyy tiettyjä rajoitteita. Varhaiset kiteytymisen asteet eivät erottuneet FLM-kuvissa, koska kiteisen aineen alapuolella olevan amorfisen muodon fluoresenssisignaali sekoittui kiteisen muodon fluoresenssiin. Näytteiden kuvaaminen onnistui parhaiten, kun näytteitä kuvattiin niiden yläpinnalta, kohdentaminen tehtiin huolellisesti ja viritysintensiteetti oli riittävän pieni.

ABSTRACT

KAISA RAUTANIEMI: Crystallization kinetics of amorphous drug substance with fluorescence lifetime microscopy

Tampere University of Technology

Master of Science Thesis, 79 pages, 2 Appendix pages

May 2017

Master's Degree Programme in Natural Sciences

Major: Chemistry

Examiners: Associate Professor Timo Laaksonen and University Lecturer Elina Vuorimaa-Laukkanen

Keywords: fluorescence lifetime microscopy, crystallization, amorphous solid, indomethacin, kinetic analysis, thermal analysis

The crystallization of amorphous indomethacin was studied by fluorescence lifetime microscopy (FLM). The time-dependent fluorescence for solid indomethacin (amorphous, α - and γ -crystalline forms) was determined by FLM. According to the results the forms can be distinguished by their time-dependent fluorescence. The crystallization of amorphous indomethacin was observed in two storage conditions for 10 days: (1) at 60 °C and 0 % relative humidity (RH) and (2) at room temperature and 100 % RH. The samples stored in 60 °C crystallized rapidly on the surface and the thickness of the crystalline layer increased as the crystallization proceeded. The crystallized fraction was determined from the lifetime component proportions and fitted to several kinetic models. According to the results the crystallization was best described by diffusion-limited reaction models. FLM was not suited for observing the transformation kinetics for the samples stored at 100 % RH. The samples crystallized as dense areas surrounded by amorphous material. The imaging area should have been larger in order to represent the crystallization in the sample. Indomethacin was also crystallized by adding a drop of ethanol on the amorphous sample. The ethanol-induced crystallization was rapid and the sample was not moved between imaging measurements, so the intensities between FLM pictures were proportional. The lifetime distribution changed as the crystallization proceeded and that could be used for approximate kinetic analysis. However, the use of the lifetime distribution for kinetic analysis needs further examination. The method has certain limitations. The early stages of the crystallization could not be distinguished in FLM-pictures, because the fluorescence of the amorphous material under the crystallized indomethacin mixed with the fluorescence of the crystalline layer. The best results were acquired when the samples were measured from the top, the microscope focusing was done carefully and the excitation intensity was low enough.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laboratoriolle. Haluan kiittää työni ohjaajia akatemiatutkija Timo Laaksosta ja yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkasta työhöni saamista neuvoista ja kommentista. Erityisesti haluan kiittää Elinaa lukuisista laboratoriossa ja tuloksia käsitellen vietetyistä tunteista sekä Timoa mielenkiintoisista, työn aihetta taustoittavista keskusteluista. Kiitos, että kiireisistä aikatauluistanne huolimatta löysitte aina aikaa työni ohjaamiselle.

Kiitos yliopistonlehtori Terttu Hukalle opastuksesta DSC-laitteiston käyttämisessä ja laboratoriomestari Anne Tikkaselle käytännön avusta laboratoriossa. Kiitos myös koko kemian laboratorion henkilökunnalle ja muille diplomityöntekijöille auttavasta ja kannustavasta asenteesta sekä erityisesti hyvästä yhteishengestä.

Tampereella 18.5.2017

Kaisa Rautaniemi

LYHENTEET JA MERKINNÄT

1D diff.	yksiulotteinen diffuusiorajoitettu reaktiomalli
1. kl	ensimmäisen kertaluvun reaktiomalli
3D diff. 1	paraboloidilaista johdettu yksinkertainen kolmiulotteinen diffuusio- rajoitettu reaktiomalli
3D diff. 2	kutistuva ydin -reaktiomalli
a.u.	engl. arbitrary unit, mielivaltainen yksikkö
DSC	engl. differential scanning calorimetry, differentiaalin pyyhkäisy- kalorimetria
FCU	engl. fiber coupling unit, laserdiodien kytkentäyksikkö
FF	engl. front face, spektrofluorometrin 20° mittauskulma
FLM	engl. fluorescence lifetime microscopy, elinaikaerotteinen fluoresens- simikroskopia
IC	engl. internal conversion, sisäsiirtymä
ISC	engl. intersystem crossing, systeemien välinen siirtymä
JMAEK	Johnson–Mehl–Avrami–Erofeyev–Kholmogorov-yhtälö
MOU	engl. main optical unit, elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin optinen pääyksikkö
N.A.	engl. numerical aperture, numeerinen aukko
PD	engl. photodiode, valodiodi
RA	engl. right angle, spektrofluorometrin 90° mittauskulma
RH	engl. relative humidity, suhteellinen ilmankosteus (%)
S	singlettitila
SPAD	engl. single-photon avalanche diode, yksittäisfotonivyörydiodi
T	triplettitila
TCSPC	engl. time-correlated single photon counting, aikaerotteinen yksit- täisfotonilaskenta
TTTR	engl. time-tagged time-resolved, aikamerkitty aikaerotteinen mittaus- menetelmä
VR	engl. vibrational relaxation, vibraatiorelaksaatio
XRPD	engl. X-ray powder diffraction, jauhemaisten näytteiden röntgendif- fraktio
a	fluoresenssin elinajan amplitudi
A'	verrannollisuuserroin
$[A]$	A :n konsentraatio (mol dm^{-3})
c	valon nopeus ($2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$)

c_i	i :n konsentraatio (mol dm^{-3});
C_p	lämpökapasiteetti ($\text{J } ^\circ\text{C}^{-1} \text{ g}^{-1}$)
D	diffuusiovakio ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
E	energia (J)
f	fluoresenssin elinajan osuus
$f(\alpha)$	differentiaalimuotoinen reaktiomalli
$g(\alpha)$	integraalimuotoinen reaktiomalli
ΔG	Gibbsin energia (J g^{-1})
h	Planckin vakio ($6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$)
H	entalpia (J g^{-1})
ΔH_c	kiteytymisentalpia (J g^{-1})
ΔH_m	sulamisentalpia (J g^{-1})
I	intensiteetti (W m^{-2})
J	diffuusiovuo ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
k	nopeusvakio (s^{-1})
K	integroimisvakio
m	kertaluku
n	JMAEK-yhtälön vakio
N	lukumäärä
p	sovitettujen parametrien lukumäärä
P	teho (W)
r	säde (m)
r_c	kriittinen säde (m)
R	havaittu fluoresenssi
R_c	laskennallinen fluoresenssi
T_g	lasittumislämpötila ($^\circ\text{C}$)
T_m	sulamislämpötila ($^\circ\text{C}$)
T_c	kiteytymislämpötila ($^\circ\text{C}$)
α	konversioaste
α'	laajennettu konversioaste
γ_s	pintajännitys (N m^{-1})
λ	aallonpituus (m)
λ_{ex}	viritysaallonpituus (m)
λ_{mon}	monitorointiaallonpituus (m)
ν	taajuus (s^{-1})
ρ	tiheys (kg m^{-3})
τ	fluoresenssin elinaika (s)
τ_{av}	fluoresenssin keskimääräinen elinaika (s)
χ^2	sovituksen virhe

SISÄLLYS

1. Johdanto	1
2. Polymorfia ja amorfisuus	3
3. Termiset ominaisuudet	5
4. Kiteytyminen	7
4.1 Kiteytymisen kineettinen tarkastelu	7
4.1.1 Konversioaste	8
4.1.2 Ensimmäisen kertaluvun kiteytyminen	8
4.1.3 Ydintyminen	9
4.1.4 JMAEK-yhtälö	9
4.1.5 Yksiulotteinen diffuusiorajoitettu kiteytyminen	11
4.1.6 Kolmiulotteinen diffuusiorajoitettu kiteytyminen	12
4.2 Kiteytymisen seuraaminen	15
4.2.1 Röntgendifraktio	16
4.2.2 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	16
4.2.3 Raman-spektroskopia	17
5. Fluoresenssi	18
5.1 Jablonskin diagrammi	18
5.2 Fluoresenssin elinaika	20
6. Indometasiini	23
6.1 Indometasiinin toiminta elimistössä	23
6.2 Indometasiinin ominaisuudet kirjallisuudessa	24
6.2.1 Kiteisen indometasiinin termiset ominaisuudet	24
6.2.2 Amorfisen indometasiinin termiset ominaisuudet	25
6.2.3 Indometasiinin fluoresenssi	26
6.2.4 Indometasiinin kiteytyminen	27
7. Tutkimusmenetelmät	29
7.1 Materiaalit	29

7.1.1	Amorfisen indometasiinin valmistus	29
7.1.2	α -indometasiinin valmistus	30
7.2	Spektroskopiset menetelmät	30
7.3	Elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia	31
7.3.1	Yksittäisfotonilaskenta	32
7.3.2	Laitteisto	32
7.3.3	FLM-kuvien analysointi	34
7.4	Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	35
7.5	Kiteytymisen seuraaminen	36
8.	Tulokset ja tulosten käsittely	37
8.1	Indometasiinin fluoresenssi	37
8.1.1	Stationaarinen fluoresenssi	37
8.1.2	Aikaerotteinen fluoresenssi	39
8.2	Indometasiinin FLM-kuvaukseen liittyvät rajoitteet	42
8.2.1	Valoherkkyys	42
8.2.2	Kiteytymisen alkuvaihe	44
8.2.3	Kohdentaminen	45
8.2.4	Kontaktiongelmät	47
8.3	Kiteytymisen seuranta	49
8.3.1	Kiteytyminen lämpökaapissa	51
8.3.2	Kiteytyminen 100 % suhteellisessa ilmankosteudessa	58
8.3.3	Etanolilla aiheutettu kiteytyminen	62
8.4	Indometasiinin termiset ominaisuudet	66
9.	Yhteenveto ja johtopäätökset	71
	Lähteet	74
	Liite 1.	80
	Liite 2.	81

1. JOHDANTO

Monien potentiaalisten lääkeaineiden huono vesiliukoisuus on jo pitkään mietityttänyt tutkijoita. Kiinteiden, suun kautta nautittavien lääkeaineiden biosaatavuus, jolla tarkoitetaan lääkeaineen verenkiertoon asti pääsevää osuutta sekä verenkiertoon päätyminen nopeutta, riippuu keskeisesti lääkevalmisteen liukoisuudesta, liukeneemisnopeudesta ja nopeudesta, jolla lääkeaine läpäisee elimistön kalvorakenteet [1]. Huonosti veteen liukenevat lääkeaineet eivät siten kulkeudu riittävän isoina määrinä elimistössä sinne, missä lääkeaineiden varsinainen toiminta tapahtuu.

Eräs ratkaisu kiinteän aineen liukoisuusominaisuuksien parantamiseen on amorfisen muodon hyödyntäminen. Toisin kuin kiteisellä aineella, amorfisen aineen molekyyleillä ei ole pitkän välimatkan järjestystä. Monet lääketeollisuudessakin käytetyt aineet kuten proteiinit ja osa sokereista esiintyvät tyypillisesti amorfisessa muodossa, ja amorfisia muotoja voidaan yleensä valmistaa yksinkertaisilla menetelmillä. Lääketeollisuuden kannalta amorfisella muodolla on kiteiseen verrattuna useita hyödyllisiä ominaisuuksia, kuten parempi vesiliukoisuus ja liukoisuusnopeus sekä joskus myös paremmat puristusominaisuudet [2]. Amorfinen muoto on kuitenkin epävakaa, ja se voi kiteytyä tuotteen valmistuksen tai säilytyksen aikana, jolloin valmisteen toiminnallisuus voi muuttua. Amorfista muotoa pyritäänkin stabiloimaan muun muassa lisäaineilla [3, 4] tai peittämällä aineen pinta nanopäällysteillä [5], jotta sitä voitaisiin hyödyntää lääkevalmisteissa.

Amorfisen muodon stabiloiminen ja kiteytymismekanismien ymmärtäminen liittyvät keskeisesti toisiinsa. Kiteytymisen seuraamisessa käytetään perinteisesti muun muassa röntgendifraktiomittauksia ja termisen analyysin menetelmiä, joista eniten käytetään differentiaalista pyyhkäisykalorimetriaa (differential scanning calorimetry, DSC). Kiteytymisen mekanismeja ei kuitenkaan tunneta vielä hyvin. Kiteytymisen seuraamiseen etsitään erityisesti menetelmiä, joilla kiteytyminen voidaan tunnistaa jo varhaisessa vaiheessa.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, miten amorfisen lääkeaineen kiteytymistä voidaan seurata elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla (fluorescence lifetime microscopy, FLM), mitkä asiat tulee ottaa huomioon näytteen käsittelyssä ja mi-

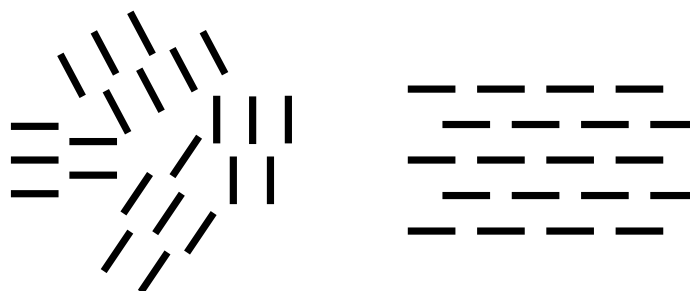
ten kiteytymisen etenemistä voidaan seurata myös kvantitatiivisesti. Mallilääkeaineena käytettiin indometasiinia, jonka fluoresenssin on havaittu muuttuvan kiteytymisen edetessä [6]. Indometasiini voi esiintyä useassa eri kidemuodossa ja sillä on myös amorfinen muoto. Elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia on kuvantava menetelmä, jota käytetään muun muassa biologisten ilmiöiden kuten kudostekenteiden muutosten ja lääkeaineiden leviämisen tutkimisessa [7, 8]. FLM-kuvissa esitetään fluoresenssin intensiteetti ja elinaika paikan funktiona. Fluoresenssin elinajalla tarkoitetaan aikaa, jonka molekyyli keskimäärin viettää virittyneessä tilassa. Toisin kuin fluoresenssin intensiteetti, elinaika ei riipu fluoresoivan aineen konsentraatiosta tai viritysaallonpituudesta [7], joten FLM-mittauksilla saadaan näytteestä fluoresenssimikroskopiaa monipuolisemmin tietoa.

Työn teoriaosuudessa määritellään tutkimuksen keskeiset käsitteet, jotka liittyvät kiinteiden aineiden polymorfiaan, faasimuutoksiin ja kiteytymiseen, johdetaan yleisimmät kiinteän olomuodon reaktioita kuvaavat kineettiset reaktiomallit sekä käydään läpi elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin toiminnan ymmärtämisen kannalta oleellinen valokemian teoria. Lisäksi esitellään tutkimuksessa käytetty mallilääkeaine yleisellä tasolla ja kootaan tälle lääkeaineelle aiemmista tutkimuksista saatuja tuloksia.

Tutkimuksessa selvitettiin amorfisen sekä α - ja γ -kiteisen indometasiinin fluoresenssin elinajat ja seurattiin amorfisen indometasiinin kiteytymistä kolmessa eri tapauksessa. Indometasiinin kiteytymistä seurattiin kymmenen vuorokauden ajan lämpökaapissa 60 °C lämpötilassa 0 % suhteellisessa ilmankosteudessa (relative humidity, RH) ja kymmenen vuorokauden ajan huoneenlämmössä 100 % RH:ssa. Kolmannessa seurannassa indometasiini kiteytettiin nopeasti etanolin avulla. Näytteet kuvattiin tietyin aikavälein elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla. FLM-tulokset sovitettiin kiteytymistä kuvaaviin kineettisiin malleihin, kun se oli mahdollista. Sekä puhtaiden näytteiden että kymmenen vuorokautta säilytettyjen näytteiden kunto tarkistettiin differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrialla. DSC-tulosten avulla arvioitiin myös kymmenen vuorokauden seurantanäytteiden kiteytymistä.

2. POLYMORFIA JA AMORFISUUS

Kiteisen aineen rakennehiukkaset ovat järjestyneet yhdenmukaisena toistuvaksi kiderakenteeksi. Joidenkin aineiden hiukkaset voivat järjestyä useammiksi eri kiderakenteiksi. Jos hiukkanen on alkuaine, ilmiötä kutsutaan yleensä allotropiaksi [9, 10]. Yleisempi nimitys ilmiölle on kuitenkin polymorfia [11, s. 13]. Osa aineista voi esiintyä kiinteässä olomuodossa myös ilman pitkällä välimatkalla yhdenmukaisena toistuvaa rakennetta, jolloin ainetta kutsutaan amorfiseksi. Amorfisessa aineessa voi silti olla lyhyen välimatkan järjestyneisyyttä, jossa vierekkäiset molekyylit ovat suuntautuneet keskenään yhdenmukaisesti. [2] Kuvassa 2.1 on esitetty yksinkertaistaen, miten hiukkaset järjestyvät amorfisessa ja kiteisessä aineessa. Kiinteiden aineiden tutkimuksissa amorfisen ja kiteisten muotojen tutkiminen on usein kietoutunut yhteen, jolloin amorfista muotoa käsitellään ikään kuin yhtenä polymorfeista.



Kuva 2.1 Mallikuva hiukkasten järjestymisestä amorfisessa ja kiteisessä aineessa vastaavassa järjestyksessä.

Amorfisella aineella on kaksi erilaista lämpötilasta riippuvaa kiinteää muotoa. Aineelle ominaista lasittumislämpötilaa matalammissa lämpötiloissa amorfinen aine on kovassa ja hauraassa lasimaisessa muodossa. Lasittumislämpötilan yläpuolella amorfisen aineen molekyylit pääsevät liikkumaan vapaammin, jolloin aine on lasimaista muotoa joustavampaa. [2, 12, s. 82–83] Lasimuodon ja joustavamman muodon lämpökapasiteetit eroavat hieman toisistaan, mitä hyödynnetään lasittumislämpötilan määrittämisessä. [12, s. 82–83] Rakenteen lisäksi myös amorfisen aineen termodynaamiset ominaisuudet eroavat kiteisen muodon ominaisuuksista. Amorfisella aineella

on kiteiseen muotoon verrattuna entalpian ja vapaaenergian ylijäämää. Amorfinen muoto ei ole siten stabiili, vaan amorfisen aineen molekyylit järjestyvät kiderakenteeksi eli aine kiteytyy ajan myötä. [2] Esimerkiksi klassisen ydintymisen malli pohjautuu aineen eri muotojen väliseen vapaaenergiaeroon [13, 14], joten amorfisen ja kiteisen muodon välisiä termodynaamisia suureita voidaan käyttää kiteytymisen teoreettisten mallien pohjana.

Amorfinen muoto voidaan saavuttaa esimerkiksi pikajäähdyttämällä: kiteinen aine sulatetaan ja sulate jäähdytetään niin nopeasti, etteivät molekyylit ehdi järjestyä yhdenmukaiseksi kiderakenteeksi. Amorfista ainetta voidaan valmistaa myös muun muassa liuottimen nopealla haihduttamisella [15, 16] tai kylmäjauhamalla [15, 17, 18]. Eri tavoilla valmistettujen amorfisten muotojen ominaisuudet eroavat usein toisistaan [15, 16, 19], eikä amorfista muotoa voi siten määritellä yksiselitteisesti ominaisuuksien kautta. Amorfisuus voidaan kuitenkin tunnistaa kiderakenteen puuttumisen ja lasittumislämpötilan olemassaolon avulla.

Kiinteiden muotojen fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ovat tyypillisesti erilaisia. Näihin kuuluvat mm. sulamispiste, liukoisuus ja liukenemisnopeus, mekaaniset ominaisuudet sekä tiheys. Useiden kiinteiden muotojen olemassaolo voi siten vaikuttaa suoraan lääkkeen valmistamiseen, säilymiseen, liukoisuuteen ja biosaatavuuteen. Muoto voi vaikuttaa myös esimerkiksi lääkkeen tabletointiominaisuuksiin. [11, s. 10–11] Amorfisella muodolla on yleensä kiteisiä muotoja parempi liukoisuus ja ne liukenevat kiteisiä muotoja nopeammin, joten niillä on parempi biosaatavuus. Amorfinen muoto voi kuitenkin helposti kiteytyä käsittelyn tai säilytyksen aikana, jolloin myös sen toiminnallisuus voi muuttua. [2] Jotta amorfista muotoa voitaisiin hyödyntää nykyistä paremmin, amorfisen muodon kiteytymistä pyritään ymmärtämään entistä yksityiskohtaisemmin ja etsitään myös keinoja, jolla kiteytyminen voitaisiin estää tai sitä voitaisiin ainakin hidastaa.

3. TERMISET OMINAISUUDET

Aineen amorfisuus tai kidemuoto voidaan usein tunnistaa helposti ja nopeasti termisen analyysin menetelmillä kuten differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrialla [12, s. 101–102]. Termisellä analyysillä tutkitaan aineen ominaisuuksien ja lämpötilan välistä yhteyttä. Termisiä ominaisuuksia ovat muun muassa faasimuutoslämpötilat ja -entalpiat, lämpökapasiteetti ja lasittumislämpötila.

Kiinteän aineen faasimuutoksessa aine muuttuu nestemäiseksi, kaasumaiseksi tai toiseen polymorfiseen muotoon. Muutos havaitaan kiderakenteen ominaisuuksien muuttumisena faasimuutospisteessä eli faasimuutoslämpötilassa ja -paineessa. Faasimuutokset voidaan jakaa ensimmäisen ja toisen kertaluvun faasimuutoksiin. Ensimmäisen kertaluvun faasimuutoksiin liittyy latenttilämpö eli entalpia ΔH (J g^{-1}), joka sitoutuu aineeseen tai vapautuu aineesta faasimuutoksessa. Muutoksen aikana näyte on heterogeeninen, eli siinä on samanaikaisesti läsnä sekä alkuperäistä että uutta faasia. Toisen kertaluvun faasimuutokseen ei liity latenttilämpöä ja muutos on homogeeninen, jolloin aineeseen ei muodostu faasien välisiä rajapintoja. [20, s. 2–4] Faasimuutosten jako on peräisin Gibbsin vapaaenergian ΔG (J g^{-1}) kytköksestä faasimuutoksiin: ensimmäisen kertaluvun faasimuutos havaitaan Gibbsin energian ensimmäisen derivaatan eli tilavuuden tai entropian muutoksena ja vastaavasti toisen kertaluvun faasimuutos havaitaan ΔG :n toisen derivaatan, esimerkiksi lämpökapasiteetin tai puristettavuuden, muutoksena. [21] Määritelmä on kuitenkin turhan yleistävä ja nykyisin sen käyttöä vältetään [20, s. 2].

Puhtaan aineen olomuodon muutokset ja muutokset polymorfien välillä ovat ensimmäisen kertaluvun faasimuutoksia [20, s. 4], eli niihin liittyy myös tunnettu entalpiamuutos. Kiteytymisessä vapautuu energiaa ($\Delta H < 0$) eli se on eksotermisen tapahtuma ja sulaminen sitoo energiaa ($\Delta H > 0$), joten se endotermisen tapahtuma. [12, s. 79, 84]

Lämpökapasiteetti C_p ($\text{J g}^{-1} \text{K}^{-1}$) kertoo, paljonko aineeseen täytyy sitoutua energiaa, jotta sen lämpötila nousee yhden asteen [12, s. 68]. Lasittumislämpötila on amorfiselle aineelle ominainen lämpötila-alue, jossa aineen lämpökapasiteetti muuttuu. Lasittumislämpötilana käytetään yleensä lämpötilaa, jossa puolet aineesta on

saavuttanut joustavan muodon lämpökapasiteetin eli niin sanottua midpoint-arvoa. Lasittumislämpötila on kineettinen suure, joka riippuu jossain määrin lämmitys- ja jäähdytysnopeudesta sekä aineen termisestä historiasta, eikä se siten ole varsinainen faasimuutos. Lämpökapasiteetin muutos lasittumisalueella on yleensä pieni, minkä lisäksi lasittumisalueella tapahtuu usein entalpiarelaksaatioita, jotka voivat peittää lämpökapasiteetin muutoksen osittain tai kokonaan. [12, s. 82–83] Lasittumislämpötilan määrittäminen voi siksi olla hankalaa.

Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria eli DSC (differential scanning calorimetry) on terminen analyysimenetelmä, jolla mitataan näytteeseen sitoutuvaa tai näytteen vapauttamaa energiavirtausta lämpötilan funktiona. [12, s. 68] DSC:n mittaustulos esitetään lämpökuvaajana, jota kutsutaan DSC-kuvaajaksi. Termiset tapahtumat nähdään DSC-kuvaajassa endo- tai eksotermisinä piikkeinä tai lämpökapasiteetin eli DSC-kuvaajan pohjaviivan muutoksena. Piikin lämpötila voidaan määrittää joko tapahtuman alkulämpötilasta (onset) tai piikin huipun lämpötilasta (peak). Lasittumislämpötilan lisäksi myös osa muista DSC-mittauksilla määritetyistä suureista riippuu mittauksissa käytetystä lämmitysnopeudesta. Lämmitysnopeuden kasvaessa peak-arvot siirtyvät korkeampaan lämpötilaan, mutta onset-arvot ja tapahtuman entalpiamuutokset pysyvät vakioina lämmitysnopeudesta riippumatta. Onset-arvot ovat siten peak-arvoja pienempiä mutta paremmin toistettavia. [12, s. 80–81] Osassa tutkimuksista DSC-tulokset raportoidaan kuitenkin peak-arvoina, joten DSC-mittauksilla määritetyt tulokset eivät ole aina keskenään verrattavissa.

4. KITEYTYMINEN

Kiteytyminen on ensimmäisen kertaluvun faasimuutos, jossa aineen molekyylit uudelleenjärjestyvät kiderakenteeksi. Aine voi kiteytyä muista olomuodoista, liuoksesta tai myös toisesta kiinteän aineen rakenteesta. Kiteytymisen ajava voima on ero alkuperäisen ja kiteisen muodon vapaaenergioissa [22]. Kiteytymistä, kuten muitakin kiinteän olomuodon reaktioita, kuvataan matemaattisilla reaktiomalleilla. Osa reaktiomalleista perustuu olettamuksiin reaktion etenemisestä ja reaktio-olosuhteista, kun taas osa reaktiomalleista pohjautuu vahvemmin kokeellisiin tuloksiin.

Käytännössä amorfisten lääkeaineiden säilyvyys riippuu olennaisesti säilytyslämpötilasta ja kosteudesta, jonka kanssa lääke joutuu kosketuksiin. Kiinteä lääkeaine on monimutkainen heterogeeninen systeemi, jossa on kiinteän faasin lisäksi läsnä sekä kaasua että nestefaasi. [11, s. 123–127] Kosteus ja korkea lämpötila lisäävät amorfisen aineen molekyylien liikkuvuutta, mikä edesauttaa kiteytymistä [23, 24].

4.1 Kiteytymisen kineettinen tarkastelu

Kineettiset reaktiomallit voidaan ilmaista joko differentiaali- tai integraalimuotoisina. Differentiaalimuotoinen reaktiomalli kuvaa reaktion edistymisnopeuden muutosta ja integraalimuotoinen malli reaktion edistymistä. Differentiaaliset reaktiomallit ovat muotoa

$$f(\alpha) = \frac{1}{k} \frac{d\alpha}{dt}, \quad (4.1)$$

jossa α on reaktion edistymistä kuvaava konversioaste, k (s^{-1}) reaktion nopeusvakio ja t (s) aika. Integraalimuotoinen reaktiomalli voidaan johtaa differentiaalimuotoisesta mallista erottamalla muuttujat ja integroimalla yhtälö 4.1 puolittain,

$$\int_0^a \frac{1}{f(\alpha)} d\alpha = k \int_0^t dt, \quad (4.2)$$

ja sijoittamalla yhtälön vasemmalle puolelle $g(\alpha) = \int_0^a (1/f(\alpha)) d\alpha$, jolloin integraalimuotoiseksi reaktiomalliksi saadaan

$$g(\alpha) = kt. \quad (4.3)$$

Reaktionopeus voidaan määrittää eri menetelmillä, kunhan ajan funktiona muuttuva suure voidaan muuttaa konversioasteeksi. [25]

4.1.1 Konversioaste

Konversioasteella α tarkoitetaan näytteen jo reagoineutta osuutta. Reaktion alkuhetkellä ($t = 0$) $\alpha = 0$ ja reaktion päätyttyä ($t = \infty$) $\alpha = 1$. Liuoksessa konversioaste määritetään yleensä konsentraation avulla

$$\alpha = 1 - \frac{[A]}{[A]_0}, \quad (4.4)$$

jossa $[A]_0$ on alkukonsentraatio (mol dm^{-3}) ja $[A]$ on konsentraatio hetkellä t . Konversioaste voidaan määrittää myös esimerkiksi massan m (kg) avulla yhtälöstä

$$\alpha = \frac{m_0 - m_t}{m_0 - m_\infty}, \quad (4.5)$$

jossa m_0 on massa hetkellä $t = 0$, m_t massa hetkellä t ja m_∞ massa reaktion päätyttyä [25]. Yhtälöä 4.5 voidaan käyttää konversioasteen määrittämiseen myös muiden suureiden, esimerkiksi absorbanssin, avulla.

4.1.2 Ensimmäisen kertaluvun kiteytyminen

Kertalukuihin perustuvat mallit ovat yksinkertaisimpia malleja, joilla kiteytymistä voidaan kuvata. Kertalukumallit noudattavat yhtälöä

$$\frac{d\alpha}{dt} = -k(1 - \alpha)^m, \quad (4.6)$$

jossa m on mallin kertaluku. [25] Ensimmäisen kertaluvun yhtälö on siten

$$\frac{d\alpha}{dt} = -k(1 - \alpha). \quad (4.7)$$

Erottamalla muuttujat ja integroimalla yhtälö 4.7 puolittain saadaan ensimmäisen kertaluvun integraalimuotoiseksi reaktiomalliksi

$$-\ln(1 - \alpha) = kt. \quad (4.8)$$

Yhtälö 4.8 kuvaa kiteytymistä, jonka nopeus riippuu vain yhden reaktioon osallistuvan komponentin määrästä. Ensimmäisen kertaluvun reaktiomallia noudattava kiteytyminen hidastuu kiteytymisen edetessä.

4.1.3 Ydintyminen

Kiteytymistä kuvaavat reaktiomallit voidaan jakaa yksi- ja monivaiheisiin malleihin. Kiteytymisessä on kaksi vaihetta: ydintyminen ja kasvu. Yksivaiheisissa kiteytymismalleissa ydintymisen ja kasvun oletetaan tapahtuvan samassa vaiheessa. Monivaiheisissa malleissa ydintyminen ja kasvu tapahtuvat erillisissä vaiheissa. [25]

Ydintymisessä alkuperäisen muodon A rakenteeseen muodostuu uutta kiinteää faasia B . B -muodon pienet aggregaatit aiheuttavat häiriöitä A :n rakenteeseen, joten ne ovat epävakaita ja voivat vielä muuttua takaisin A -muotoon. A :n ja B :n rajapinnalla on kaksi vastakkaista voimaa. A :n ja B :n rajapinnan pintajännitys γ_s (N m^{-1}) vastustaa ytimen kasvua, kun taas A :n ja B :n välinen vapaaenergiaero ΔG_{AB} suosii sitä. Kolmiulotteisessa tapauksessa pallon muotoiselle kiteytyneelle alueelle, jonka säde on r , näiden voimien erotus ΔG voidaan esittää yhtälöllä

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma_s - \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_{AB}. \quad (4.9)$$

ΔG on kynnysenergia, joka ytimen täytyy ylittää stabiloituakseen. ΔG saavuttaa maksimiarvonsa, kun kiteytyneen alueen koko saavuttaa kriittisen säteen r_c . ΔG :n maksimiarvo saadaan selvitettyä laskemalla yhtälön 4.9 derivaatan nollakohdat säteen suhteen

$$\frac{d(\Delta G)}{dr} = 8\pi r \gamma_s - 4\pi r^2 \Delta G_{AB} = 0, \quad (4.10)$$

joten

$$r_c = \frac{2\gamma_s}{\Delta G_{AB}}. \quad (4.11)$$

Kriittisen koon saavuttanut ydin stabiloituu ja voi aloittaa varsinaisen kasvuvaiheen. [14] Ytimiä on siten kahdenlaisia: epävakaita siemenytimiä (germ) ja vakaita kasvuytimiä (growth). Aineessa voi olla epäpuhtauksia, kulmia, halkeamia ja muita virheitä, jotka aiheuttavat vaihtelua aineen paikallisissa energioissa. Tällaisissa paikoissa kynnysenergia voi olla muuta ainetta pienempi, joten ne voivat olla ydintymiselle otollisia kohtia.

4.1.4 JMAEK-yhtälö

JMAEK-yhtälön kuvaamassa kasvussa konversioaste muuttuu sigmoidaalisesti ajan funktiona, eli kiteytymisnopeus kasvaa kiteytymisen alussa ja hidastuu kiteytymisen loppuvaiheessa. JMAEK-yhtälö perustuu kiteytymisen potenssiyhtälömalliin (power law), joka voidaan esittää yhtälöllä

$$\alpha^{1/n} = kt. \quad (4.12)$$

Yhtälössä 4.12 n on vakio, joka liittyy kiteen kasvun ulottuvuuksien määrään. [25] Potenssiyhtälön kuvaaman kiteytymisen nopeus kiihtyy kiteytymisen edetessä.

Kiteytymisen alkuvaiheessa ytimet ovat kaukana toisistaan ja ydinten väliset vuorovaikutukset voidaan jättää huomiotta, jolloin kiteytymistä voidaan usein kuvata yhtälöllä 4.12. Kiteytymisen edetessä ydinten välisten vuorovaikutusten merkitys kasvaa, kun kasvuydinten välille muodostuu yhteisiä rajapintoja. Kiinteässä aineessa yhteisen rajapinnan muodostumisella voi olla kahdenlaisia seurauksia: ytimet voivat jatkaa kasvuaan rajapintaa lukuun ottamatta normaalisti tai ydin voi jäädä toisen ytimen alle. Kasvamatta jääneitä haamuytimiä ei kuitenkaan voida kokeellisesti tunnistaa, joten kokeellisesti määritetty konversioaste ei vastaa teoreettisesti määritettyä konversioastetta. [25, 22]

Ongelman ratkaisuksi on ehdotettu laajennettua konversioastetta α' . Ajan dt aikana konversioaste kasvaa $d\alpha$:n verran ja laajennettu konversioaste $d\alpha'$:lla. Laajennetun konversioasteen muutoksesta vain osa vastaa todellisen konversioasteen muutosta. Vain osuudessa $1 - \alpha$ eli vielä muuttumattomassa osassa tapahtunut kiteisyyden kasvu vaikuttaa α :n arvoon. α :n ja α' :n välinen riippuvuus voidaan kirjoittaa muodossa [25, 22]

$$d\alpha = d\alpha'(1 - \alpha), \quad (4.13)$$

josta saadaan uudelleen järjestämällä ja puolittain integroimalla

$$\alpha' = -\ln(1 - \alpha). \quad (4.14)$$

Sijoittamalla α' konversioasteen tilalle yhtälöön 4.12, saadaan

$$(-\ln(1 - \alpha))^{1/n} = kt. \quad (4.15)$$

Yhtälöä 4.15 kutsutaan Johnson–Mehl–Avrami–Erofeyev–Kholmorogov- eli JMAEK-yhtälöksi. [25] JMAEK-yhtälössä k on ydintymis- ja kasvunopeudesta riippuva vakio ja n on kasvuolosuhteille ja kasvun ulottuvuuksille ominainen vakio. Kaksiulotteisessa kasvutapahtumassa $n = 2$, jos kasvuvaiheeseen siirryttäessä kaikki kasvuytimet ovat jo läsnä ja alkavat kasvaa. Kun uusia ytimiä syntyy kiteytymisen jokaisessa vaiheessa, $n = 3$ ja puhutaan jatkuvasta tai homogeenisestä ydintymisestä. Vastaavat luvut kolmiulotteisessa kasvutapahtumassa ovat 3 ja 4. [14] JMAEK-yhtälö on myös yhteydessä kertalukumalleihin. Kun $n = 1$, yhtälö 4.15 on identtinen ensimmäisen kertaluvun reaktiomallin (yhtälö 4.8) kanssa.

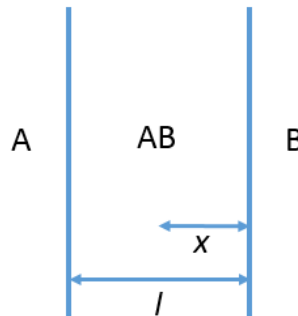
4.1.5 Yksiulotteinen diffuusiorajoitettu kiteytyminen

Liuoksissa reaktioon osallistuvat molekyylit voivat liikkua ja vuorovaikuttaa melko vapaasti. Sen sijaan kiinteässä aineessa molekyylien liike on rajoitettua, minkä seurauksena reaktiot tapahtuvat usein rajapinnoilla. Diffuusiorajoitetuissa reaktioissa reaktiotuote muodostuu rajapinnalle tasaiseksi kerrokseksi, jonka läpimitta kasvaa reaktion edetessä. Reaktiotuotekerroksen kasvaessa kiteytymisnopeus hidastuu, koska diffundoituminen reaktiotuotekerroksen läpi hidastuu kerroksen kasvaessa.

Diffuusiolla tarkoitetaan aineen siirtymistä suuremmasta konsentraatiosta kohti pienempää konsentraatiota. Diffuusiovuo J ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) eli yksikköalan läpi yksikköajassa diffundoitunut konsentraatio on Fickin ensimmäisen lain mukaan

$$J = -D \frac{dc}{dx}, \quad (4.16)$$

jossa D on diffuusiovakio. [26, s. 855] Käsitellään reaktiota $A + B \rightarrow AB$, jossa reaktiotuotekerroksen paksuus on l (m) ja B :n tulee diffundoitua reaktiotuotekerroksen läpi, jotta reaktio voisi tapahtua. Merkitään B :n diffundoitumaa matkaa kirjaimella x . Tilanne on esitetty kuvassa 4.1.



Kuva 4.1 Mallikuva yksiulotteisesta diffuusiorajoitetusta reaktiosta. Aineen B tulee diffundoitua reaktiotuotekerroksen AB (paksuus l) läpi, jotta A ja B voivat reagoida.

Reaktiotuotekerroksen paksuuden muutosnopeus dl/dt on verrannollinen diffuusiovuohon, ja se voidaan ilmaista yhtälöllä

$$\frac{dl}{dt} = -A'D \frac{dc_B}{dx}, \quad (4.17)$$

jossa A' on verrannollisuuskertoimen ja c_B B :n konsentraatio [25]. Oletetaan B :n konsentraation muutosnopeuden reaktiotuotekerroksessa olevan vakio, jolloin yhtälö 4.17 saadaan muotoon

$$\frac{dl}{dt} = -A'D \frac{c_{B,2} - c_{B,1}}{l}, \quad (4.18)$$

jossa $c_{B,2}$ on B :n konsentraatio A :n ja AB :n rajapinnalla ja $c_{B,1}$ on B :n konsentraatio B :n ja AB :n rajapinnalla. Erottamalla muuttujat ja integroimalla puolittain saadaan

$$l^2 = 2A'D(c_{B,2} - c_{B,1})t. \quad (4.19)$$

Merkitään $k = 2A'D(c_{B,2} - c_{B,1})$, jolloin

$$l^2 = kt. \quad (4.20)$$

Yhtälöä 4.20 kutsutaan paraboloidilaiksi. Yksinkertaisimmassa diffuusiorajoitetussa tapauksessa reaktio tapahtuu äärettömällä tasaisella pinnalla. Tällöin konversioaste on suoraan verrannollinen reaktiotuotekerroksen paksuuteen, eli

$$\alpha^2 = k't, \quad (4.21)$$

jossa k' on vakio. Yhtälö 4.21 kuvaa yksiulotteista diffuusiorajoitettua mallia. [25]

Kiinteiden aineiden kiteytymistä ei yleensä kuvata yksiulotteisella diffuusiorajoitetulla kiteytymismallilla. Amorfisen magnesiumipohjaisen metalliseoksen on kuitenkin eräässä tutkimuksessa huomattu noudattavan paraboloidilakia kiteytymisen alussa, mutta pidemmällä aikavälillä kiteytyminen on noudattanut sigmoidaalista JMAEK-yhtälöä [27].

4.1.6 Kolmiulotteinen diffuusiorajoitettu kiteytyminen

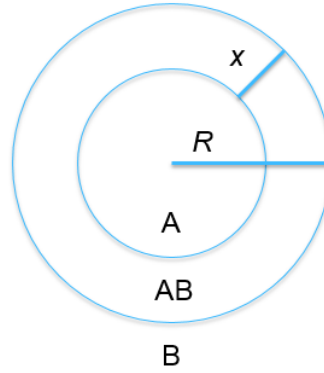
Kolmiulotteisessa tapauksessa diffuusiorajoitettua mallia kutsutaan kutistuva ydin (shrinking core) -malliksi. Kutistuva ydin -mallissa kiteytyvien yksiköiden oletetaan olevan palloja, joiden säde on R . Reaktio alkaa pallon pinnalta ja etenee kohti ydintä eli reagoimaton ydin pienenee reaktion edetessä. Kuvassa 4.2 on esitetty mallikuva yksittäisestä reagoivasta hiukkasesta. Kuvassa R on pallon säde ja x reaktiotuotekerroksen AB paksuus. Reagoimattoman ytimen säde on tällöin $R - x$.

Pallon muotoisen rajapinnan läpäisevä diffuusiovuoto muuttuu pallon säteen r funktiona. Sen sijaan pallon pinnan läpi diffundoituva kokonaisainemäärä ei riipu säteestä, joten [28, s. 721–722]

$$J4\pi(r + \Delta r)^2 - J4\pi r^2 = 0. \quad (4.22)$$

Johdetaan seuraavaksi yhtälö B :n konsentraatiolle säteen funktiona. Jakamalla yhtälö 4.22 $4\pi\Delta r$:llä ja ottamalla raja-arvo $\Delta r \rightarrow 0$, saadaan

$$\lim_{\Delta r \rightarrow 0} \frac{J(r + \Delta r)^2 - Jr^2}{\Delta r} = \frac{d(Jr^2)}{dr} = 0. \quad (4.23)$$



Kuva 4.2 Kiteytyvä yksikkö kutistuva ydin -mallissa. *A* on reagoimaton ydin, *AB* reaktiotuotekerros ja *B* aine, jonka tulee diffundoitua kerroksen *AB* läpi, jotta reaktio voi tapahtua.

Merkitään $x = r$ ja sijoitetaan diffuusiovuo (yhtälö 4.16) yhtälöön 4.23, jolloin

$$\frac{d}{dr} \left(-D \frac{dc}{dr} r^2 \right) = 0. \quad (4.24)$$

Koska $D \neq 0$, yhtälö voidaan jakaa puolittain $-D$:llä:

$$\frac{d}{dr} \left(\frac{dc}{dr} r^2 \right) = 0. \quad (4.25)$$

Yhtälön 4.25 integraali on

$$\frac{dc}{dr} r^2 = K_1, \quad (4.26)$$

josta saadaan järjestämällä uudelleen ja integroimalla puolittain

$$\int dc = K_1 \int \frac{1}{r^2} dr \quad (4.27)$$

$$c = \frac{-K_1}{r} + K_2. \quad (4.28)$$

K_1 ja K_2 ovat integroimisvakioita. Kuvan 4.2 perusteella hiukkasen ulkopinnalla eli *AB*:n ja *B*:n rajapinnalla $r = R$, ja vastaavasti *AB*:n ja *A*:n rajapinnalla $r = R - x$. Olkoon *B*:n konsentraatio säteen funktiona c_r , hiukkasen ulkopinnalla c_R ja *AB*:n ja *A*:n rajapinnalla c_{R-x} . Yhtälön 4.28 avulla voidaan määrittää konsentraation suhteellinen muutos säteen funktiona [28, s. 722]:

$$\frac{c_r - c_{R-x}}{c_R - c_{R-x}} = \frac{-1/r + 1/(R-x)}{-1/R + 1/(R-x)}. \quad (4.29)$$

A :n ja AB :n rajapinnalla reaktion voidaan olettaa tapahtuvan diffuusiota nopeammin, jolloin $c_{R-x} \approx 0$ [25, 28, s.722]. Yhtälöstä 4.29 tulee nyt

$$\frac{c_r}{c_R} = \frac{1/(R-x) - 1/r}{1/(R-x) - 1/R}, \quad (4.30)$$

joten konsentraatio säteen funktiona on

$$c_r = \frac{c_R R(r - (R-x))}{r(R - (R-x))}. \quad (4.31)$$

Reaktio tapahtuu A :n ja AB :n rajapinnalla, joten lasketaan Fickin ensimmäistä lakia (yhtälö 4.16) varten konsentraation c_r derivaatta, kun $r = R - x$:

$$\left. \frac{dc_r}{dr} \right|_{r=R-x} = \frac{Rc_R}{(R-x)x}, \quad (4.32)$$

jolloin Fickin ensimmäinen laki saadaan muotoon

$$J = -D \frac{dc_r}{dr} = -D \frac{Rc_R}{(R-x)x}. \quad (4.33)$$

Reaktiorajapinnan kasvunopeus dx/dt on verrannollinen yhtälöön 4.32:

$$\frac{dx}{dt} = A'D \frac{dc_r}{dr} = A'D \frac{Rc_R}{(R-x)x}, \quad (4.34)$$

jossa A' on vakio, joka liittyy reagoimattoman ytimen massan muutokseen [28, s. 723].

Kohti integraalimuotoista reaktiomallia päästään merkitsemällä $k = A'Dc_R$, erottamalla muuttujat ja integroimalla puolittain:

$$\frac{dx}{dt} = k \frac{R}{(R-x)x}, \quad (4.35)$$

$$x^2 \left(\frac{1}{2} - \frac{x}{3R} \right) = kt. \quad (4.36)$$

Kiteytynyt osuus halutaan ilmoittaa reaktiotuotekerroksen paksuuden sijaan konversioasteella, jotta reaktiomallia voidaan soveltaa kokeelliseen aineistoon. Konversioaste voidaan laskea yhtälöstä 4.5. Reaktion lopussa kiteytyvän yksikön oletetaan olevan täysin reagoanut, jolloin $m_\infty \approx 0$. Jos reaktiotuotekerroksen paksuus on x , hiukkasten tiheys ρ (kg m^{-3}) ja hiukkasten lukumäärä N , konversioaste voidaan

ilmaista yhtälöllä

$$\alpha = \frac{N\frac{4}{3}\rho\pi R^3 - N\frac{4}{3}\rho\pi(R-x)^3}{N\frac{4}{3}\rho\pi R^3} = 1 - \left(\frac{R-x}{R}\right)^3, \quad (4.37)$$

josta voidaan ratkaista reaktiotuotekerroksen paksuus konversioasteen funktiona:

$$x = R(1 - (1 - \alpha)^{1/3}). \quad (4.38)$$

Sijoittamalla x yhtälöstä 4.38 yhtälöön 4.36 ja järjestelemällä uudelleen saadaan reaktiomalliksi

$$1 - \frac{2}{3}\alpha - (1 - \alpha)^{2/3} = kt. \quad (4.39)$$

Yhtälö 4.39 on integraalimuodossa esitetty kutistuva ydin -reaktiomalli. Kutistuva ydin -mallilla kuvataan lukuisia keskenään hyvin erilaiseltakin vaikuttavia reaktioita: yhtälö kuvaa esimerkiksi tablettien liukenemista vatsalaukussa tai tuhkerakkeen muodostumista palavan hiilen ympärille [28, s. 719].

Yksinkertaisempi lähestymistapa kolmiulotteisten hiukkasten reaktiokinetiikkaan perustuu yksiulotteiselle diffuusiolle johdettuun paraboloidiyhtälöön (yhtälö 4.20). Konversioasteena käytetään kuitenkin yhtälön 4.38 konversioastetta, joka on määritetty kolmiulotteiselle, pallon muotoiselle hiukkaselle. Sijoitetaan yhtälön 4.20 l :n tilalle reaktiotuotekerroksen paksuus x yhtälöstä 4.38:

$$R^2(1 - (1 - \alpha)^{1/3})^2 = kt. \quad (4.40)$$

Merkitään $k' = k/R^2$, jolloin reaktiomalliksi tulee

$$(1 - (1 - \alpha)^{1/3})^2 = k't. \quad (4.41)$$

Yhtälö 4.41 ei ota huomioon, miten diffuusio muuttuu ytimen säteen funktiona, joten se pätee vain pienillä konversioasteilla.

4.2 Kiteytymisen seuraaminen

Kiteytymistä seurataan perinteisesti röntgendiffraktio-, DSC- ja Raman-mittauksilla. Menetelmien avulla voidaan tunnistaa kiinteän aineen muoto ja arvioida näytteiden kiteisyyttä. Myös monia muita menetelmiä, kuten infrapunaspektroskopiaa [16] ja ydinmagneettista resonanssia [17], käytetään kiteytymisen seuraamisessa. Perinteisten menetelmien lisäksi myös esimerkiksi fluoresenssin intensiteetin muutosta on käytetty onnistuneesti seurattaessa indometasiinin kiteytymistä [6].

4.2.1 Röntgendiffraktio

Jauhemaisten näytteiden röntgendiffraktio (X-ray powder diffraction, XRPD) on näytteiden kiinteän muodon karakterisointiin ja kiteytymisen seurantaan vakiintunut menetelmä. Röntgendiffraktio perustuu röntgensäteiden sirontaan kiderakenteesta. Sirontakulma riippuu Braggin lain mukaisesti kidetasojen välisestä etäisyydestä, joten kiderakenteiden diffraktiokuviot eroavat toisistaan ja kiderakenne voidaan tunnistaa diffraktiokuvion perusteella [29]. Koska amorfisella muodolla ei ole kiderakennetta, säteet siroavat moneen eri suuntaan, jolloin röntgendiffraktiokuviossa ei erotu yksittäisiä piikkejä kuten kiteisillä näytteillä. Röntgendiffraktiota käytetään eräänä amorfisen muodon määritelmänä: kun näytteen röntgendiffraktiokuviossa ei enää erotu kiderakenteeseen viittaavia piikkejä, näyte on amorfinen (x-ray amorphous).

Piikkien intensiteetin avulla voidaan arvioida myös osittain kiteytyneiden näytteiden kiteytymisastetta [15, 3, 18, 30], ja sitä voidaan hyödyntää myös seosten kiteytymisen seurantaan [31]. Menetelmällä voidaan tunnistaa muoto, johon näytteet kiteytyvät, mittaukset ovat nopeita eivätkä tuhoa näytteitä. Röntgendiffraktion havaitsemisraja on kuitenkin noin 10 %, joten sen avulla ei havaita pieniä kiteisyys- tai amorfisuusasteita [32].

4.2.2 Differentiaallinen pyyhkäisykalorimetria

Differentiaallinen pyyhkäisykalorimetria on toinen kiinteiden näytteiden karakterisointiin rutiininomaisesti käytetty menetelmä. Menetelmää käytetään pääasiassa näytteiden kunnon tarkistamiseen: näytteiden kidemuoto tai amorfisuus voidaan tunnistaa termisten ominaisuuksien kuten sulamispisteen, sulamisentalpian ja mahdollisen lasittumislämpötilan avulla.

Myös differentiaalista pyyhkäisykalorimetriaa voidaan käyttää kiteytymisen seuramisessa. Kiteytymistä voidaan arvioida muun muassa kiteytymisentalpian ja kiteytymislämpötilan avulla. DSC-mittauksia on käytetty erityisesti jäännöskiteisyyden arvioinnissa, kun näytteen amorfisuutta on lisätty kylmäjauhamalla. [18, 17, 33, 34]. Myös lasittumisalueen lämpökapasiteetin muutoksen avulla voidaan arvioida näytteiden kiteisyyttä [16]. DSC-mittauksen aikana näytteissä tapahtuu polymorfisia muutoksia ja muita termisiä tapahtumia, joten samaa näytettä ei voi mitata useaan kertaan.

4.2.3 Raman-spektroskopia

Raman-spektroskopia on valon epäelastiseen sirontaan perustuva spektroskopinen menetelmä. Näytteeseen ohjataan monokromaattista sähkömagneettista säteilyä, josta osa osuu näytteen molekyyliin ja siroaa. Sironta voi olla elastista tai epäelastista: edellisessä sironneen säteilyn taajuus ei muutu, mutta jälkimmäisessä taajuus on suurempi tai pienempi kuin alkuperäisen säteilyn taajuus. Energian siirtymät vastaavat näytteen funktionaalisten ryhmien vibraatio- ja rotaatiotasoja, joten Raman-spektrien tulkinta muistuttaa infrapunaspektrien tulkintaa, vaikka spektrit ovatkin keskenään erilaisia. Eräs Raman-spektroskopian etu infrapunaspektroskopiaan verrattuna liittyy näytteissä olevaan kosteuteen. IR-spektreissä vesi näkyy voimakkaana piikkeinä, jotka voivat peittää alleen muita, tärkeämpiä värähtelyitä. Veden Raman-sironta on kuitenkin heikkoa, joten kosteus ei häiritse Raman-spektrien tulkintaa. [26, s. 432–434]

Raman-piikkien intensiteettiä voidaan käyttää myös kvantitatiiviseen analyysiin, joten se soveltuu kidemuotojen tunnistamisen lisäksi myös kiteytymisen seurantaan. Näytteitä ei tarvitse erikseen valmistella mittauksia varten, mikä vähentää näytteiden vahingoittumisen todennäköisyyttä. [32] Raman-spektroskopia on differentiaalista pyyhkäisykalorimetriaa ja PXRD:tä herkempi menetelmä: sen avulla voidaan havaita jopa 1 % kiteisyys- tai amorfisuusaste [32] ja matalan taajuuden Raman-spektroskopiolla on tunnistettu vielä varhaisempia kiteytymisen vaiheita [35]. Raman-sironnan todennäköisyys on kuitenkin pieni (yleensä $<10^{-6}$) [26, s. 432–434], joten Raman-signaali on usein heikko, minkä lisäksi se voi peittyä näytteen fluoresenssin alle [36]. Sironnan pienen todennäköisyyden vuoksi Raman-spektriä mitattaessa käytetään tehokkaita lasereita, jolloin laser voi kuumentaa näytettä ja näyte voi kiteytyä tai muuten vahingoittua. [32]

5. FLUORESENSSI

Valokemia on kemian osa-alue, jossa tutkitaan sähkömagneettisen säteilyn aiheuttamia kemiallisia ja fysikaalisia muutoksia. Valokemialliset ja valofysikaaliset prosessit perustuvat sähkömagneettisen säteilyn absorptioon, jossa fotonin energia siirtyy molekyyliin ja molekyyli virittyy. Valoa absorboivien molekyylien rakenteessa on ainakin yksi kromoforiksi kutsuttu ryhmä, joka absorboi valoa. [37, s. 32] Fotonin energia E (J) on määritelty seuraavasti:

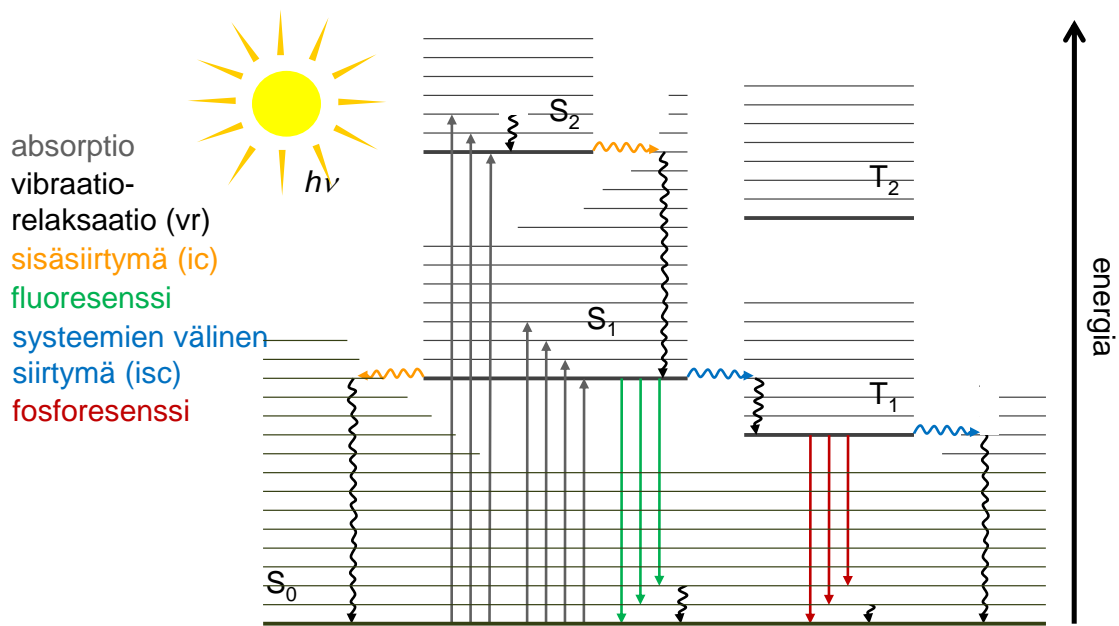
$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (5.1)$$

jossa h on Planckin vakio ($6,626 \times 10^{-34}$ J s), ν fotonin taajuus (s^{-1}), c valon nopeus tyhjiössä ($2,998 \times 10^8$ m s^{-1}) ja λ fotonin aallonpituus (m). Molekyylin virityksessä ainakin yksi sen elektroneista siirtyy alemmalla energiatilalla korkeammalle energiatilalle. Virittyminen voi tapahtua, jos molekyyliin törmäävän fotonin energia on yhtä suuri kuin kahden energiatilan välinen erotus. [37, s. 3–5] Viritystila voi purkautua useaa eri reittiä pitkin, joista erästä kutsutaan fluoresenssiksi.

5.1 Jablonskin diagrammi

Elektronien siirtymiä energiatilojen välillä kuvataan Jablonskin diagrammin (kuva 5.1) avulla. Valon absorption seurauksena elektroni siirtyy alimmalta singlettitalalta virittyneelle singlettitalalle. Singlettitalalla tarkoitetaan tilaa, jossa perustilan ylimmällä orbitaalilla olevan elektronin ja virittyneellä tilalla olevan elektronin spinit ovat vastakkaisuuntaiset, eli tilan kokonaisspin $S = 0$ ja kerrannaisuus (multiplicity) $2S + 1 = 1$. Singlettitalaa merkitään tunnuksella S . S_0 vastaa perustilalla olevaa singlettia, S_1 ensimmäistä virittyntä singlettitalaa jne., eli alaindeksin kasvaessa tilan energia kasvaa. Jokaista virittyntä singlettitalaa vastaa triplettilata, joita merkitään vastaavasti T_1, T_2 jne. Triplettilatassa perustilan ylimmän orbitaalin elektronilla ja virittyneellä tilalla olevalla elektronilla on samansuuntainen spin, jolloin kokonaisspin $S = 1$ ja kerrannaisuus $2S + 1 = 3$. [38, s. 21–22]

Elektronisten viritystilojen väliset energiaerot ovat verrattain suuria ja ne tapahtuvat ultraviolettisäteilyn ja näkyvän valon aallonpituuksilla. Elektronisen energian lisäksi molekyyleillä on liike-energiaa, joka jaetaan vibraatio- ja rotaatioenergiatiloihin. Vibraatiotilojen väliset siirtymät tapahtuvat infrapunasäteilyn alueella ja rotaatiotilojen väliset siirtymät mikroaaltojen aallonpituuksilla. [26, s. 414] Elektronisten viritystilojen väliset energiaerot ovat merkittävästi suurempia kuin vibrationaalisten energiatilojen väliset erot, ja vastaavasti vibrationaalisten energiatilojen väliset erot ovat merkittävästi suurempia kuin rotationaalisten energiatilojen väliset erot. Viritystiloja käsitellessä huomioidaan yleensä vain elektroniset ja vibrationaaliset energiatilat.



Kuva 5.1 Jablonskin diagrammi. Singlettitilat on merkitty kirjaimella *S* ja triplettitilat kirjaimella *T*. Kuvassa käytetty värikoodi on esitetty kuvan vasemmassa laidassa. Suorat viivat vastaavat säteileviä siirtymiä ja aaltoviivat säteilemättömiä siirtymiä.

Molekyyli voi virittyessään siirtyä perustilalta eri elektronisille viritystiloille. Viritystilojen purkautuminen voi tapahtua sekä säteilevillä että säteilemättömillä siirtymillä: säteilevissä siirtymissä ylimääräinen energia siirtyy ympäristöön fotonina ja säteilemättömissä siirtymissä esimerkiksi lämpönä. Ensimmäistä virittyneyttä singlettitilaa korkeammat elektroniset viritystilat relaksoituvat S_1 -tilalle säteilemättömillä sisäsiirtymillä (internal conversion, IC). Sisäsiirtymä on siirtymä kahden isoenergeettisen eli kokonaisenergialtaan yhtä suuren vibrationaalisen tilan välillä. Sisäsiirtymässä kerrannaisuus säilyy. [38, s. 41] Elektronisen viritystilan alinta vibraatiotilaa

korkeammat vibraatiotilat purkautuvat esimerkiksi törmäyksissä liuoksen molekyylien kanssa lämpönä ympäristöön. Tämän vibraatiorelaksaation jälkeen vain alin vibraatioenergiatila on merkittävästi miehittynyt. [38, s. 37] Sekä vibraatiorelaksaatio että sisäsiirtymä ovat nopeita siirtymiä: vibraatiorelaksaatioon tyypillisesti kuluva aika on $10^{-13} - 10^{-9}$ s ja sisäsiirtymään virittyneiden tilojen välillä kuluva aika $10^{-14} - 10^{-11}$ s [37, s. 51].

S_1 -tila voi purkautua kolmea eri reittiä, jotka voidaan esittää yhtälöillä

$$S_1 \xrightarrow{k_r} S_0 + h\nu, \quad (5.2)$$

$$S_1 \xrightarrow{k_{ic}} S_0, \quad (5.3)$$

$$S_1 \xrightarrow{k_{isc}} T_1, \quad (5.4)$$

joissa k_r on säteilevän siirtymän nopeusvakio, k_{ic} sisäsiirtymän nopeusvakio ja k_{isc} systeemien välisen siirtymän nopeusvakio. Yhtälö 5.2 kuvaa fluoresenssia. Fluoresenssi on säteilevä siirtymä, jossa molekyyli luovuttaa ylimääräisen energiansa emittoimalla fotonin. S_1 -tila voi purkautua myös säteilemättömästi sisäsiirtymän ja vibraatiorelaksaation kautta, mikä on esitetty yhtälössä 5.3.

Yhtälössä 5.4 viritystila purkautuu systeemien välisellä siirtymällä (intersystem crossing, ISC) singlettitalalta triplettilitalalle. Systeemien välisessä siirtymässä kerrannaisuus ei säily eli siirtymä on kvanttimekaanisten valintasääntöjen vastainen. Käytännössä tämä tarkoittaa, että siirtymän todennäköisyys on pieni ja siirtymään kuluu enemmän aikaa kuin sisäsiirtymään. Myös T_1 -tila on virittynyt, ja se voi purkautua S_0 -tilalle joko säteilevällä siirtymällä (yhtälö 5.5), tai säteilemättömästi uuden systeemien välisen siirtymän ja vibraatiorelaksaation kautta (yhtälö 5.6). [38, s. 41]

$$T_1 \xrightarrow{k_r} S_0 + h\nu, \quad (5.5)$$

$$T_1 \xrightarrow{k_{isc}} S_0. \quad (5.6)$$

Yhtälön 5.5 kuvaamaa säteilevää siirtymää T_1 -tilalta S_0 -tilalle kutsutaan fosforesenssiksi. Kielletyn siirtymän vuoksi fosforesenssi on fluoresenssia hitaampi prosessi. Tyypillinen fosforesenssiin kuluva aika on 10^{-3} – 10^2 s, kun taas fluoresenssiin kuluu tyypillisesti 10^{-12} – 10^{-6} s [37, s. 52–53].

5.2 Fluoresenssin elinaika

Fluoresenssin elinajalla tarkoitetaan aikaa, jonka molekyyli keskimäärin on virittynä. Virittyneen S_1 -tilan purkautumisnopeus riippuu säteilevien ja säteilemättö-

mien siirtymien nopeusvakioista ensimmäisen kertaluvun reaktiomallin mukaisesti, mikä voidaan esittää yhtälöllä [38, s. 42–44]

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -k_r[S_1] - k_{ic}[S_1] - k_{isc}[S_1], \quad (5.7)$$

jossa t on aika (s) ja $[S_1]$ S_1 -tilan konsentraatio. Fluoresenssin elinaika τ (s) on kääntäen verrannollinen fluoresenssin ja säteilemättömien siirtymien nopeusvakioiden summaan [38, s. 42–44]:

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_{isc}}, \quad (5.8)$$

jolloin yhtälö 5.7 saadaan muotoon

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -\frac{[S_1]}{\tau}. \quad (5.9)$$

Erottamalla muuttujat ja integroimalla puolittain saadaan muotoiltua yhtälö S_1 -tilan konsentraatiolle ajan funktiona:

$$[S_1] = [S_1]_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (5.10)$$

Käytännössä fluoresenssin elinaika havaitaan fluoresenssin intensiteetin I (W m^{-2}) vaimenemisena ajan funktiona. Jos fluoresoivalla aineella on N elinaikaa, joista kunkin amplitudi on a_i , fluoresenssin intensiteetti voidaan esittää yhtälöllä

$$I(t) = \sum_{i=1}^N a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}. \quad (5.11)$$

Elinajan amplitudi kuvaa kunkin elinajan määrää vaimenemiskuvaajassa. Amplitudin sijaan käytetään usein paremmin vertailtavaa suuretta, elinajan osuutta f_i , joka on määritelty yhtälöllä

$$f_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^N a_i \tau_i}. \quad (5.12)$$

Elinajojen osuuksien summa on yksi. [38, s. 171–173] Osuudet voidaan esittää myös suhteellisina osuuksina, jolloin osuudet esitetään prosenttilukuina. Fluoresenssin elinaika määritetään laskennallisesti sovittamalla yhtälö 5.11 kokeelliseen vaimenemiskuvaajaan. Fluoresenssin vaimeneminen voidaan määrittää kokeellisesti esimerkiksi yksittäisfotonilaskijalla (single-photon counting, SPC).

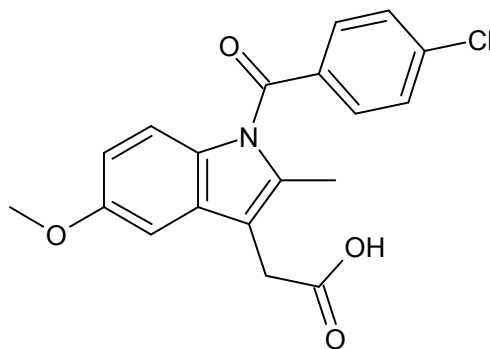
Kun fluoresenssin aikariippuvuus on moniekspontiaalinen, elinajan kuvaamiseen käytetään myös keskimääräisen elinajan τ_{av} käsitettä, joka voidaan määritellä useal-

la eri tavalla [38, s. 171–173]. Tässä työssä keskimääräisellä elinajalla tarkoitetaan keskimääräistä aikaa, joka kuluu emittoitujen fotonien detektorille saapumiseen virityspulssin jälkeen. Jos fluoresenssin elinaikoja on useita, fluoresenssin elinaikojen ja amplitudien yksiselitteinen määrittäminen on vaikeaa, koska sovitettavia muuttujia on useita. Eri elinaikojen ja amplitudien arvoilla voidaan saada hyvinkin samanlaiset laskennalliset vaimenemiskuvaajat. [39, s. 103]

Vaikka fluoresenssin vaimenemiskuvaaja noudattaisi kaksi- tai korkeampieksponentiaalista vaimenemista, sillä ei välttämättä ole todellisuudessa kahta tai useampaa erillistä elinaikaa. Esimerkiksi molekyylien välisten vuorovaikutusten, kuten ei-fluoresoivien kompleksien muodostumisen ja energian siirtymisen molekyylien välillä, seurauksena vaimenemiskuvaaja voi olla ei-eksponentiaalinen. Ei-eksponentiaaliseen vaimenemiskäyrään voidaan yleensä tehdä monieksponentiaalinen elinaikasovitus, mutta sovituksen parametreja ei voida selittää fysikaalisesti. [39, s. 158] Joissain tapauksissa mitattujen elinaikojen jakauma kuvaa tutkittavaa ilmiötä elinaikasovitusta paremmin. [38, s. 185–186]

6. INDOMETASIINI

Amorfisen muodon kiteytymistä ja stabilointia tutkittaessa käytetään mallilääkeaineita, joita on tutkittu paljon ja joiden ominaisuudet tunnetaan verrattain hyvin. Indometasiini on yksi paljon käytetyistä mallilääkeaineista. Indometasiini on ei-steroidinen tulehduskipulääke, jonka rakennekaava on esitetty kuvassa 6.1.



Kuva 6.1 Indometasiinin rakennekaava.

Indometasiinille on raportoitu jopa seitsemän erilaista kiderakennetta [40], minkä lisäksi sillä on myös amorfinen muoto. Amorfinen indometasiini kiteytyy säilytyksen aikana tavallisesti γ -kiteiseksi, α -kiteiseksi tai näiden kidemuotojen seokseksi [24, 23], joten tässä työssä kidemuotojen käsittely on rajattu γ - ja α -muotoihin. Huoneenlämmössä ja normaalipaineessa γ -indometasiini on polymorfeista termodynaamisesti stabiilein.

6.1 Indometasiinin toiminta elimistössä

Ei-steroidisten tulehduskipulääkkeiden toiminta perustuu ainakin osittain erään kudoshormonityypin, prostaglandiinien, synteesin estämiseen. [41] Elimistö reagoi vaurioihin tulehdustilalla, jonka tehtävänä on eristää vaurioitunut alue ja poistaa vaurion aiheuttaja elimistöstä. Tulehdus havaitaan yleensä tulehtuneen alueen kipuna, turvotuksena, punoituksena ja lämpönä. Tulehdus käynnistyy solujen tuottaessa

välittäjäaineita ja kudoshormoneja, jotka laajentavat verisuonia, tehostavat niiden läpäisevyyttä ja herkistävät kudoksia muille välittäjäaineille. Laajentuneiden verisuonten ulkopuolelle tiihuu nestettä, joka sisältää mm. kudovaurioiden korjaamiseen osallistuvia proteiineja sekä valkosoluja, jotka tuhoavat infektion aiheuttaneet aineet. [42, s. 257–258, 372–373]

Indometasiini on tehokas prostaglandiinisynteesin inhibiittori. Indometasiinia käytetään mm. reuman, kihdin ja nivelrikon hoitoon sekä leikkausten jälkihoitoon. [41] Prostaglandiineja on elimistössä toistakymmentä erilaista, ja niillä on lukuisia, toisilleen vastakkaisiakin vaikutuksia elimistön toimintaan [42, s. 372–373]. Indometasiini estää muidenkin kuin tulehdusta aiheuttavien prostaglandiinien synteesiä, joten sen käyttö aiheuttaa myös haittavaikutuksia. Näistä yleisimpiä ovat ruuansulatuselimistön ärsytys ja päänsärky. [41]

Vaikka amorfisen indometasiinin liukoisuus veteen on selvästi kiteistä parempi [43], lääkevalmisteissa käytetään jauhattua γ -kiteistä indometasiinia. Kiteinen indometasiini on käytännössä riittävän vesiliukoinen ja edullinen lääkeaine, jotta sitä voidaan käyttää tulehduskipulääkkeenä. Indometasiinia ja muita mallilääkeaineita tutkimalla saatua tietoa amorfisesta muodosta ja kiteytymisestä voidaan kuitenkin hyödyntää muiden, kalliimpien ja vielä huonommin veteen liukenevien lupaavien lääkeaineiden stabiloinnissa.

6.2 Indometasiinin ominaisuudet kirjallisuudessa

Erilaisen vesiliukoisuuden lisäksi amorfisen, γ - ja α -kiteinen indometasiini eroavat toisistaan myös monilta muilta ominaisuuksiltaan. Yksi selkeimmistä eroista on indometasiinin väri: amorfisen indometasiini on keltaista ja läpikuultavaa, kun taas γ - ja α -kiteiset muodot ovat valkoisia ja läpinäkymättömiä. Myös eri muotojen spektroskopiset ja termiset ominaisuudet eroavat toisistaan. Ominaisuuksien erot johtuvat molekyylien erilaisesta järjestymisestä: γ -indometasiinissa molekyylit muodostavat dimeerejä, α -indometasiinin toistuva yksikkö on kolmen konformaatioltaan erilaisen indometasiinimolekyylin muodostama trimeeri [44], ja amorfisessa muodossa molekyyleillä ei ole pitkän välimatkan järjestyneisyyttä.

6.2.1 Kiteisen indometasiinin termiset ominaisuudet

Puhtaan, kiteisen α - ja γ -indometasiinin DSC-kuvaajassa esiintyy vain yksi endoterminen sulamispiikki. Taulukkoon 6.1 on koottu DSC-mittauksilla määritettyjä

kirjallisuusarvoja α - ja γ -kiteisen indometasiinin sulamislämpötilalle T_m ($^{\circ}\text{C}$) ja sulamisentalpialle ΔH_m (J g^{-1}).

Taulukko 6.1 Kirjallisuusarvoja γ - ja α -kiteisen indometasiinin sulamislämpötiloille T_m ja sulamisentalpioille ΔH_m .

kidemuoto	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_m (J g^{-1})	lähde
α	156	94,1	[45]
	152	97	[46]
γ	161	104,9	[45]
	162	106	[46]

Taulukon 6.1 arvot on määritetty eri lämmitysnopeuksilla [45, 46], joten sulamislämpötilat eroavat hieman toisistaan. Indometasiinin kidemuodot voidaan kuitenkin selvästi erottaa toisistaan sulamispisteiden ja sulamisentalpoiden avulla.

6.2.2 Amorfisen indometasiinin termiset ominaisuudet

Amorfinen indometasiini kiteytyy DSC-mittauksen aikana lasittumislämpötilan yläpuolella α - ja γ -indometasiinin seokseksi. Kiteytyminen havaitaan eksotermisenä kiteytymispiikkinä DSC-kuvaajassa lasittumislämpötilan ja sulamisen välillä. Sulaminen havaitaan kahtena sulamispiikkinä, joiden lämpötilat vastaavat α - ja γ -indometasiinin sulamista. Taulukkoon 6.2 on koottu DSC-mittauksilla määritettyjä kirjallisuusarvoja amorfisen indometasiinin lasittumislämpötilalle T_g ($^{\circ}\text{C}$), lasittumisalueen lämpökapasiteetin muutokselle ΔC_p ($\text{J g}^{-1} \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$), kiteytymislämpötilalle T_c ($^{\circ}\text{C}$) ja kiteytymisentalpialle ΔH_c (J g^{-1}). Taulukon arvot on koottu tuloksista, joissa amorfisen indometasiini on valmistettu pikajähdyttämällä γ -kiteisestä indometasiinista. Arvot on määritetty DSC-mittauksilla lämmitysnopeudella $10 \text{ } ^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Taulukkoon on merkitty viivalla (-) arvot, joita ei esitetty tutkimuksessa.

Taulukko 6.2 Kirjallisuusarvoja amorfisen indometasiinin lasittumislämpötilalle T_g , lasittumisalueen lämpökapasiteetin muutokselle ΔC_p , kiteytymislämpötilalle T_c ja kiteytymisentalpialle ΔH_c .

T_g ($^{\circ}\text{C}$)	ΔC_p ($\text{J g}^{-1} \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$)	T_c ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_c (J g^{-1})	lähde
$43,0 \pm 0,4$	-	$122,7 \pm 1,1$	$-87,7 \pm 6,3$	[19]
$45,9 \pm 1,0$	$0,32 \pm 0,02$	$104,1 \pm 2,1$ (peak)	-	[16]
$41,25 \pm 1,16$	$0,50 \pm 0,03$	$96,93 \pm 1,02$ (onset)	-	[15]

Veden on havaittu madaltavan indometasiinin lasittumislämpötilaa: jo 1 m-% vesipitoisuus madaltaa T_g :tä noin $10 \text{ } ^{\circ}\text{C}$ [23]. Erot T_g -arvoissa johtuvat siten todennäköisesti

näytteiden sisältämästä kosteudesta. Lasittumislämpötila ei riipu näytteen kiteisyydestä tai valmistustavasta, mutta lasittumisalueen lämpökapasiteetin muutoksen suuruus viittaa näytteen kiteisyysasteeseen. Amorfisilla näytteillä $\Delta C_p \approx 0,3 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ tai enemmän, mutta osittain kiteisillä näytteillä lämpökapasiteetin muutos on pienempi. [16, 19]

Taulukkoon 6.3 on koottu vertailun vuoksi kylmäjauhamalla valmistetuille amorfisille näytteille määritettyjä T_c - ja ΔH_c -arvoja. Ensimmäinen näyte on valmistettu kylmäjauhamalla γ -kiteistä indometasiinia 7 h ajan. Kaksi jälkimmäistä näytettä on valmistettu pikajäähdyttämällä γ -indometasiinia ja kylmäjauhamalla saatua amorfista ainetta vielä tunnin ajan. Myös näissä mittauksissa lämmitysnopeutena on ollut $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Taulukko 6.3 Kirjallisuusarvoja kylmäjauhamalla (kj.) valmistetun amorfisen indometasiinin kiteytymislämpötilalle T_c ja kiteytymisentalpialle ΔH_c .

valmistustapa	T_c ($^\circ\text{C}$)	ΔH_c (J g^{-1})	lähde
7 h kj. γ pikajäähdytetty γ :	$88,7 \pm 10,93$ (onset)	$-65,1 \pm 5,93$	[17]
1 h kj.	$84,8 \pm 0,1$ (onset)	$-72,4 \pm 0,3$	[18]
1 h kj.	$106,6 \pm 0,7$	$-71,6 \pm 0,6$	[19]

Eri menetelmillä valmistetut amorfiset muodot eroavat toisistaan, joten eri tavalla valmistettujen amorfisten muotojen tuloksia ei voi suoraan verrata keskenään ja ne voivat myös kiteytyä eri tavalla [15, 16]. Taulukoiden 6.2 ja 6.3 perusteella amorfisen indometasiinin termisten ominaisuuksien välillä on melko paljon hajontaa. Tulosten väliset erot johtuvat luultavasti amorfisen muodon luonteesta, eli näytteet eivät samankaltaisestakaan valmistusmenetelmästä huolimatta ole samanlaisia.

6.2.3 Indometasiinin fluoresenssi

Fluoresenssispektroskopiaa käytetään yleisesti orgaanisten molekyylien tutkimiseen liuoksessa. Indometasiininakin fluoresenssiominaisuuksia on tutkittu pääasiassa liuoksessa, jolloin on havaittu indometasiinin fluoresenssin olevan herkkä liuottimen poolisuudelle. Kun indometasiinimolekyyli on virittynyt singlettitalle, tapahtuu varausensiirtoreaktio, jossa negatiivinen varaus siirtyy indolirenkaasta bentsyyliiryhmälle. Pooliset liuottimet stabiloivat varautunutta tilaa, jolloin viritystilan energia on lähempänä perustilan energiaa. Kun viritystilan ja perustilan välinen energiaero on pieni, säteilemättömien siirtymien nopeus kasvaa, minkä seurauksena fluoresenssin

intensiteetti on heikompi ja emission aallonpituus suurempi kuin energiaeron ollessa suuri. Vastaavasti poolittomissa liuottimissa fluoresenssin intensiteetti on suurempi ja aallonpituus pienempi kuin poolisissa liuottimissa. [47, 48]

Fluoresenssimittauksia voidaan kuitenkin käyttää myös kiinteiden aineiden tutkimisessa. Fluoresenssispektroskopisissa mittauksissa näyte ei tuhoudu kuten esimerkiksi DSC-mittauksissa, minkä lisäksi mittaukset ovat nopeita ja yksinkertaisia tehdä.

Kiinteän indometasiinin eri muotojen fluoresenssin maksimiaallonpituudet ja fluoresenssin intensiteetit eroavat toisistaan. Taulukossa 6.4 on esitetty sekä amorfisen indometasiinin että γ - ja α -indometasiinin fluoresenssin maksimiaallonpituudet. Fluoresenssin intensiteetti on suurin γ -indometasiinilla ja pienin amorfisella indometasiinilla. α -indometasiinin fluoresenssin intensiteetti on jonkin verran amorfisen indometasiinin fluoresenssin intensiteettiä suurempi. [6]

Taulukko 6.4 Amorfisen indometasiinin sekä γ - ja α -indometasiinin fluoresenssin maksimiaallonpituudet $\lambda_{em,max}$ [6].

muoto	$\lambda_{em,max}$ (nm)
amorfinen	520
γ	460
α	500

Indometasiinin fluoresenssin elinajalle ei ollut saatavilla yksiselitteisiä arvoja kirjallisuudessa. Veden ja etanolin seoksessa indometasiinin fluoresenssin on raportoitu vaimenevan kaksiekspontiaalisesti. Lyhyemmän komponentin elinaika oli käytetyn mittalaitteiston havaintorajan (1,2 ns) alapuolella. Pidemmän komponentin elinaika riippui veden ja etanolin osuuksista liuoksessa eli liuoksen viskositeetista. Kun viskositeetti oli pieni, elinaika oli n. 10 ns ja viskositeetin ollessa suurimmillaan myös elinaika saavutti maksimiarvonsa 27,8 ns. [49] Kiteiselle indometasiinille on arvioitu aikaerotteisen Raman-spektrin taustasta fluoresenssin elinajaksi 2,1 ns ja amorfiselle indometasiinille 2,3 ns [36].

6.2.4 Indometasiinin kiteytyminen

Amorfisen indometasiinin kiteytymistä kuvataan yleensä JMAEK-yhtälöllä (yhtälö 4.15) [3, 6, 18, 23, 24, 35]. JMAEK-yhtälön vakiot riippuvat näytteiden valmistustavasta, hienojakoisuudesta ja säilytysolosuhteista. Joissain tapauksissa [3, 30] kasvulosuhteita ja kasvun ulottuvuuksia kuvaava vakio $n = 0$, eli kiteytyminen on

noudattanut ensimmäisen kertaluvun reaktiokinetiikkaa, jolloin kiteytymisnopeus on kiteytymisen alussa nopea ja hidastuu kiteytymisen edetessä. Tilanteissa, kun $n < 2$, $n:n$ arvon ei kuitenkaan ole tulkittu kuvaavan kiteytymismekanismia [3, 18] Yleensä kiteytymisen alussa esiintyy kuitenkin induktioaika, jolloin kiteytymisnopeus kasvaa reaktion alussa [6, 35, 18, 24, 23]. Vakio n on tällöin yleensä 2–3 [6, 35], jonka perusteella kasvutapahtuma on kaksiulotteinen mutta ydintymisnopeus riippuu mm. hiukkaskoosta [6].

Amorfinen indometasiini kiteytyy säilytyksen aikana säilytysolosuhteista riippuen joko stabiiliin γ -muotoon tai metastabiiliin α -muotoon. Indometasiinin kidemuodot voidaan erottaa ulkonäön perusteella toisistaan: α -indometasiini kiteytyy ohuina neulasina ja γ -indometasiini kiteytyy tiivisrakenteisina kiekkoina [50, 51]. Muoto, johon amorfinen indometasiini kiteytyy, riippuu säilytystilan lämpötilasta ja suhteellisesta kosteudesta. Yleistäen voidaan sanoa, että matalassa lämpötilassa ja pienessä suhteellisessa ilmankosteudessa indometasiini kiteytyy γ -muotoon ja korkeassa lämpötilassa sekä korkeassa suhteellisessa ilmankosteudessa indometasiini kiteytyy α -muotoon. Myös kiteytymisnopeus kasvaa lämpötilan ja suhteellisen ilmankosteuden kasvaessa [23, 24]. Indometasiini kiteytyy eri tavoin lasittumislämpötilan ala- ja yläpuolella. 0 % RH:ssa indometasiini kiteytyy lasittumislämpötilan alapuolella todennäköisemmin γ - kuin α -kidemuotoon, lähellä lasittumislämpötilaa indometasiini kiteytyy molempiin kidemuotoihin ja korkeissa lämpötiloissa (yli 60 °C) indometasiini kiteytyy todennäköisemmin α - kuin γ -muotoon. [24] Suhteellisella ilmankosteudella ei ole vastaavaa raja-arvoa säilytyksen aikana kiteytyvälle muodolle. Esimerkiksi 30 °C lämpötilassa indometasiinin on raportoitu kiteytyvän α -muotoon yli 43 % RH:ssa [23] tai vasta 100 % RH:ssa [30], mutta indometasiinin on myös raportoitu kiteytyvän vielä 100 % RH:ssa T_g :n yläpuolella 45 °C lämpötilassa γ -kidemuotoon [6].

Orgaanisten molekyylien kiteytymisen mekanismeja ei toistaiseksi tunneta yksityiskohtaisesti. Joissain olosuhteissa kiteiden on esimerkiksi huomattu kasvavan huomattavasti nopeammin kuin perinteiset kineettiset mallit ennustavat. Nopeaa kiteytymistä voi tapahtua sekä amorfisen aineen pinnalla [51, 50] että näytteen sisällä [52]. Kiteiden kasvu on usein nopeampaa amorfisen aineen pinnalla kuin näytteen sisällä, mikä voi johtaa kiteiden kasvuun myös näytteen pinnasta ylöspäin [51, 50]. Kiteiden kasvu ylöspäin pysähtyy lasittumislämpötilan yläpuolella neulamaisina kiteinä kasvavilla kidemuodoilla kuten α -indometasiinilla, mutta γ -indometasiinikiteiden on huomattu kasvavan pinnan yläpuolella myös lasittumislämpötilan yläpuolella [51]. Kiteytymismekanismien ymmärtäminen on keskeistä kehitettäessä menetelmiä, joilla kiteytyminen voidaan estää tai sitä voidaan ainakin hidastaa.

7. TUTKIMUSMENETELMÄT

Indometasiinin eksitaatio- ja fluoresenssispektrit määritettiin spektrofluorometrillä ja fluoresenssin elinajat määritettiin elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla. Elinajaerotteista fluoresenssimikroskooppia käytettiin kiteytymisen seurantaan kolmessa seurantatutkimuksessa. Sekä puhtaiden kiteisten että seurantänäytteiden kunto tarkistettiin differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrialla.

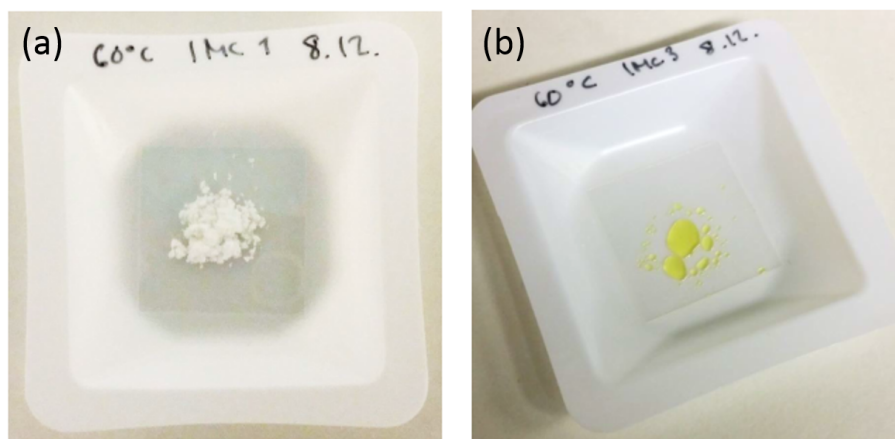
7.1 Materiaalit

Tutkimuksessa käytetty kaupallinen indometasiini (valmistaja Orion Finland) oli γ -kiteistä. Kaupallista indometasiinia käytettiin sellaisenaan määrittäessä γ -indometasiinin ominaisuuksia. Amorfinen ja α -kiteinen indometasiini valmistettiin γ -indometasiinista.

7.1.1 Amorfisen indometasiinin valmistus

Amorfinen indometasiini valmistettiin sulattamalla γ -indometasiinia lämpölevyllä 175 °C lämpötilassa joko alumiinisella punnitusalustalla tai suoraan mikroskooppilasilla. Sulate jäähdytettiin nopeasti siirtämällä näyte sulatusastiassa viileälle tiskipöydälle, josta näytteet siirrettiin muutaman minuutin kuluttua NaOH-eksikaattoriin (0 % RH) vähintään tunniksi ennen mittauksia. Yksittäisen mikroskooppilasille valmistetun amorfisen indometasiininäytteen massa oli noin 10 mg. Kuvassa 7.1 on esitetty γ -kiteinen indometasiini mikroskooppilasilla ennen sulatusta (a) ja mikroskooppilasille valmistettu amorfinen näyte (b).

Kuvasta 7.1 nähdään, että γ -indometasiini on valkoista ja läpinäkymätöntä ja amorfinen indometasiini keltaista ja läpikuultavaa. Myös α -indometasiini oli valkoista ja läpinäkymätöntä kuten γ -indometasiini.



Kuva 7.1 γ -kiteistä indometasiinia (a) ja tuore amorfinen indometasiininäyte (b) mikroskooppilasilla.

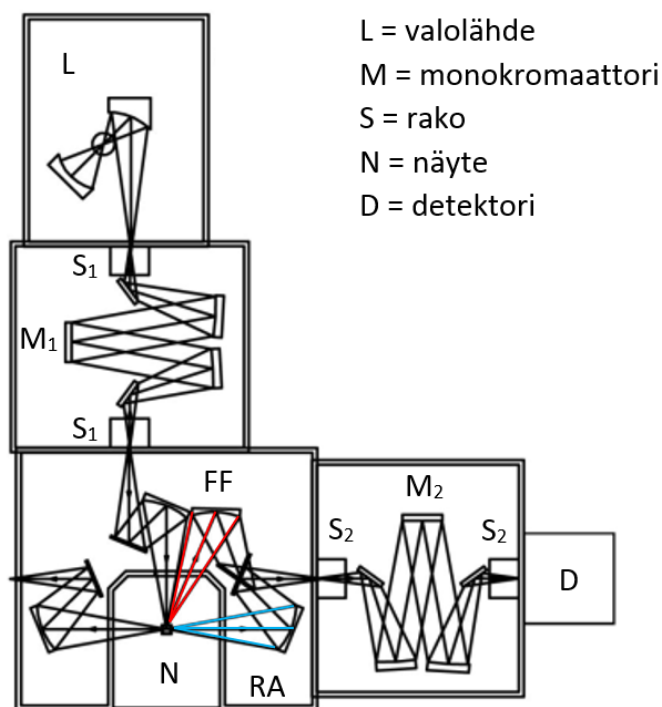
7.1.2 α -indometasiinin valmistus

α -indometasiini valmistettiin uudelleenkiteyttämällä etanolista [53]. γ -indometasiini liuotettiin pystyjäähdytyksen alla pieneen määrään etanolia ja kylläinen, noin 80-asteinen etanoliliuos kaadettiin keitinlasiin, jossa oli huoneenlämpöistä tislattua vettä. Kiteytynyt indometasiini erotettiin liuottimesta heti sekoittamisen jälkeen imusuodattamalla. Indometasiinin etanoliliuos oli väriltään keltaista, mutta kiteet olivat valkoisia. Kiteiden annettiin kuivua NaOH-eksikaattorissa yli vuorokauden ajan ennen jatkokäsittelyä. DSC-kuvaajan perusteella uudelleenkiteytetty indometasiini oli α -kiteistä.

7.2 Spektroskopiset menetelmät

Kiinteille indometasiininäytteille määritettiin fluoresenssi- ja eksitaatiospektrit. Fluoresenssispekttriä mitatessa näytettä viritetään jatkuvasti viritysaallonpituudella, ja samalla mitataan näytteen fluoresenssin intensiteetti aallonpituuden funktiona. Eksitaatiospekttriä mitatessa seurataan puolestaan aallonpituuksia, joiden absorption seurauksena havaitaan fluoresenssi monitorointiaallonpituudella. Eksitaatiospektri vastaa näytteen absorptiospekttriä, jos näyte sisältää vain yhtä fluoresoivaa muotoa. Sen sijaan, jos näyte muodostaa perustilassa useita muotoja kuten aggregaatteja tai komplekseja, eksitaatiospektri ei vastaa absorptiospekttriä. [38, s. 52–53]

Fluoresenssi- ja eksitaatiospektrit mitattiin Fluorolog Yobin Yvon-SPEX -spektrofluorometrillä. Spektrofluorometrin rakenne on esitetty kuvassa 7.2.



Kuva 7.2 Spektrofluorometrin rakenne. Kuvaan on merkitty 20° mittauskulma (FF) punaisella ja 90° mittauskulma (RA) sinisellä. Muut lyhenteet on selitetty kuvassa. Kuva on muokattu lähteestä [54].

Spektrofluorometrin valolähteen, joka on merkitty kuvaan 7.2 kirjaimella *L*, ja näytteen *N* välissä on monokromaattori *M*₁, jolla säädetään virittävän valon aallonpituutta. Viritysraon *S*₁ leveyden avulla säädetään aallonpituuden tarkkuutta eli aallonpituusaluetta, jolla jokainen mittapiste mitataan. [38, s. 156–158] Fluoresenssi mitataan yleensä 90° kulmassa (RA, right angle) viritysvaioon nähden, jotta näytteestä ja kyvetistä heijastuva valo ei häiritsisi mittauksia. Kiinteiden näytteiden fluoresenssi mitataan kuitenkin näytteen pinnasta, jolloin fluoresenssi mitataan 20° kulmassa (FF, front face) viritysvaioon nähden. Näytteestä emittoituva valo kulkee vielä emissioraon *S*₂ ja toisen monokromaattorin *M*₂ läpi detektorille *D*. Monokromaattorilla säädetään detektorille pääsevää aallonpituusaluetta ja emissioraon leveydellä valon mitattavan aallonpituuden tarkkuutta [38, s. 156–158].

7.3 Elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia

Näytteiden elinajat määritettiin elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla (fluorescence lifetime microscope, FLM). FLM on yksittäisfotonilaskentaan perustuva kuvantava laitteisto, joka mittaa fluoresenssin intensiteettiä ja vaimenemista paikan funktiona.

7.3.1 Yksittäisfotonilaskenta

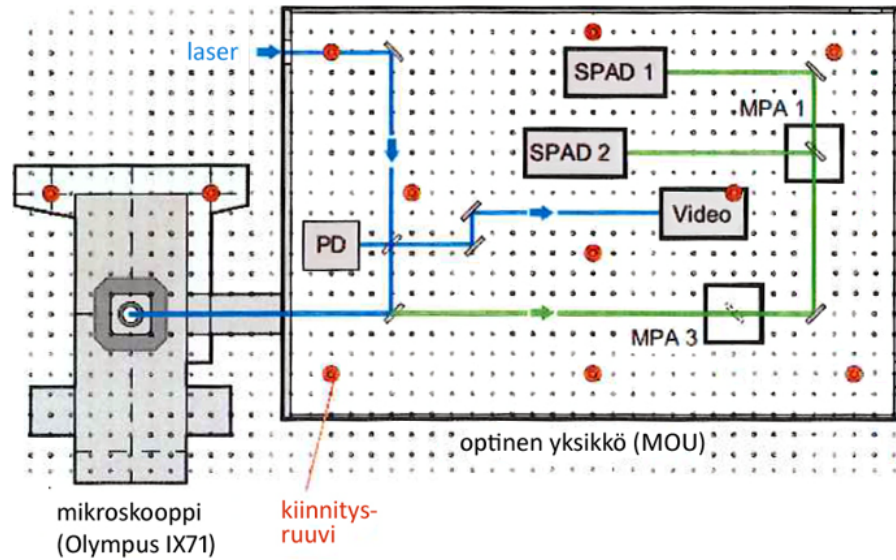
Aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta (time-correlated single photon counting, TCSPC) on menetelmä, jolla mitataan fluoresenssin vaimenemista. TCSPC mittaa aikaa, joka kuluu virityspulssista yksittäisen emittoituneen fotonin päätymiseen detektorille. Jokainen emittoitunut foton merkitään histogrammiin, jossa x -akselilla on virityksestä emissioon kuluva aika ja y -akselilla fotonien lukumäärä. Viritys-emissio-sykliä toistetaan, kunnes histogrammi kuvaa fluoresenssin vaimenemista. Tutkimuksessa käytetyn laitteiston datankeräys perustuu aikamerkittyyn aikaerotteiseen (time-tagged time-resolved, TTTR) mittaamenetelmään, joka on yksittäisfotonilaskennan erikoistapaus. TTTR-menetelmässä mitataan TCSPC-histogrammin lisäksi aikaa, joka kuluu fotonien detektorille saapumiseen suhteessa mittauksen alkuhetkeen. TTTR mahdollistaa siten TCSPC:tä pidempien aikaskaalojen tutkimisen. [55, 56]

7.3.2 Laitteisto

Tutkimuksessa käytetty elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskooppi MicroTime 200 koostuu Olympus IX71 -mikroskoopista, viritysjärjestelmästä, optisesta pääyksiköstä (main optical unit, MOU) sekä elektroniikasta, jolla tallennetaan informaatiota ja hallitaan laitteistoa. Informaation tallennus- ja laitteiston hallintaelektronikan keskeisin osa on fluoresenssin elinaikaa TTTR-menetelmällä mittaava PicoHarp 300 -moduuli. TTTR-signaalin lisäksi kerätään myös fluoresenssin paikan kertovia merkkisignaaleja, joiden avulla saadaan rakennettua kaksiulotteinen FLM-kuva fluoresenssisignaaleista. Laajin alue, joka voidaan kuvata yhdellä mittauksella, on $80 \times 80 \mu\text{m}$, ja mittapisteitä voi olla enintään 512×512 . Kuvien koko ja resoluutio eli pikselin koko valittiin tapauskohtaisesti. Diffraktiorajan määrittämä laitteiston erotuskyky paikan suhteen on noin 300 nm.

Olympus IX71 on käänteinen fluoresenssimikroskooppi, johon näytteet kiinnitetään ja jonka optiikkaa hyödynnetään FLM-kuvien ottamisessa. Näytteet kiinnitetään mikroskoopin näytepidikkeeseen mikroskooppilasilla. Mittauksissa käytettiin kahta objektiivia: satakertaisesti suurentavaa öljyimmissio-objektiivia (numeerinen aukko $N.A. = 1,4$) ja 40-kertaisesti suurentavaa ilmaobjektiivia ($N.A. = 0,65$). Öljyimmissio-objektiivilla näytteet kuvataan mikroskooppilasin läpi lasia vasten olevalta pinnalta ja ilmaobjektiivilla suoraan näytteen ulkopinnalta. Näyte tarkennetaan mikroskooppiin pystysuunnassa käsin tarkennuspyörällä, jonka hienosäätöasteikon yksi osaväli vastaa noin yhtä mikrometriä. Tarkennuksen onnistumista voidaan arvioida mikroskoopin okulaarin kautta sekä tarkennuksen analysointiosan videomonitoroinnin avulla. Objektiivi siirrettiin kuvattavalle alueelle (x, y) -tasossa säätöruuvien avulla.

Viritysjärjestelmään kuuluvat laserien virta- ja säätöyksikkö PDL 800-B ja yksikkö, jonne laseridiodit on kytketty (fiber coupling unit, FCU). Virta- ja säätöyksikön kautta säädetään laserin taajuutta ja intensiteettiä. Virtayksikön oskillaattorin perustaaajuus on 40 MHz, jota voidaan jakaa pienemmäksi toistotaajuutta muuttamalla. FCU:sta viritysvälo ohjataan kuitua pitkin optiseen pääyksikköön (main optical unit, MOU), joka on esitetty kuvassa 7.3.



Kuva 7.3 Elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin pääyksikön (MOU) rakenne. Kuvaaan on merkitty valodiodiyksikkö PD, säteenjakajat MPA 3 ja MPA 1 sekä yksittäisfotonivörydiodit SPAD 1 ja SPAD 2. Kuva on muokattu lähteestä [55].

Pääyksikössä on neljä osaa: viritysoosa, konfokaaliyksikkö, tarkennuksen analysointiosa ja detektorit. Välo ohjataan ensin säteenjakajalle, josta 10–20 % säteen intensiteetistä heijastuu viritysvälon intensiteettiä (a.u., mielivaltainen yksikkö) mittaavaan valodiodiyksikköön (photodiode, PD). Loput välostä jatkaa puoliläpäisevälle peilille, joka ohjaa viritysvälon mikroskoopin sivuportin ja objektiivin läpi näytteeseen. Näytteen emittoima välo sekä näytteestä siroava välo ohjataan mikroskoopin optiikan läpi takaisin pääyksikköön, jossa puoliläpäisevä peili erottaa siroaneen välon ja emittoitun välon toisistaan. Siroannut välo ohjataan tarkennuksen analysointiosaan ja emittoitunut välo ohjataan konfokaaliyksiköstä kahden säteenjakajan (MPA 3 ja MPA 1) kautta detektoreille. Detektoreina käytetään yksittäisfotonivörydiodia (single photon avalanche diode, SPAD), joiden mittaalue on 400–900 nm.

Näytteestä siroannutta viritysväloa voidaan käyttää mikroskoopin tarkennuksen analysointiin. Optisen pääyksikön säteenjakaja ohjaa välon tarkennuksen analysointiosaan, jossa välo ohjataan peilien kautta CCD-kameralle. Objektiiville saapuvaa vä-

loa monitoroidaan jatkuvasti emissiosta riippumatta. Kohdentaminen on onnistunut, kun sopivalla intensiteetin arvolla intensiteettijakauman hienorakenne erottuu selvästi monitorointikuvassa ja on muodoltaan symmetrinen. Kohdentamista arvioidaan myös fluoresenssin time trace -signaalin eli jatkuvasti mitatun fluoresenssin intensiteetin avulla. Huonon kohdennuksen seurauksena fluoresenssin intensiteetti on heikko, ja vastaavasti onnistuneen kohdennuksen seurauksena havaitun fluoresenssin intensiteetti on suurempi.

Mittauksissa viritysvauna käytettiin pulssitettua PicoQuant LDH-P-C-405 -diodilaseria, jonka aallonpituus on 405 nm ja aikaresoluutio 60 ps. Mittauksissa käytetty toistotaajuus oli 10 MHz. Näytteeseen päästetty valodiodin mittaama intensiteetti oli 30 a.u., ja mittauksissa käytetty suodatin päästi detektorille aallonpituudet 430 nanometristä ylöspäin. Valomikroskooppikuvat otettiin valokuvaamalla näytettä mikroskoopin okulaarin kautta.

7.3.3 FLM-kuvien analysointi

Elinaikaerotteiset fluoresenssimikroskooppikuvat analysoitiin SymPhoTime-ohjelmalla. FLM-kuvissa erilaiset keskimääräiset elinajat erottuvat eri väreillä ja fluoresenssin intensiteetti kuvan valoisuusasteena siten, että kuvan korkein intensiteetti skaalautuu kirkkaimmaksi. Kuvia tarkasteltiin myös ilman intensiteettimodulaatiota, jolloin erot eri elinaikoja sisältävien alueiden välillä olivat selkeämmät.

Fluoresenssin elinajat laskettiin SymPhoTime-ohjelman sovituksella. Elinajasovitus tehtiin vaimenemiskuvaajaan vaimenemisen intensiteettimaksimista 60 nanosekuntiin asti. Ohjelma arvioi sovituksen virhettä χ^2 -testillä:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N \left(\frac{R(t_i) - R_c(t_i)}{R(t_i)} \right)^2, \quad (7.1)$$

jossa N on pisteiden lukumäärä, p sovitettujen parametrien lukumäärästä riippuva vakio, $R(t_i)$ on havaittu fluoresenssi ja $R_c(t_i)$ laskennallinen fluoresenssi ajan t funktiona [38, s. 181–182].

Kuvan alue, jolta elinaika laskettiin, valittiin tapauskohtaisesti. Alueet valittiin kuitenkin siten, että elinajasovitus tehtiin tasalaatuiselle alueelle ja sovituksen virhe pyrittiin pitämään pienenä (yleensä $\chi^2 \leq 1,6$). Ohjelmalla tarkasteltiin lisäksi elinajakajauksia sekä joissain tapauksissa näytteiden intensiteettiprofileja.

7.4 Differentiaaalinen pyyhkäisykalorimetria

Differentiaaalinen pyyhkäisykalorimetria eli DSC on terminen analyysimenetelmä, jolla mitataan näytteessä tapahtuvia entalpiamuutoksia lämpötilan tai ajan funktiona. Lämpövuoto-DSC mittaa näytteeseen ja vertailunäytteeseen ohjattujen lämpömärien eroa lämpötilan funktiona, kun lämpötilaa kontrolloidaan lämpötilaohjelmalla. Näytteen ominaisuuksien muuttuessa näyte sitoo tai luovuttaa energiaa. Näyte- ja vertailunäyttekuppien lämpötilat halutaan kuitenkin pitää samoina, joten näytteisiin ohjataan eri lämpövuoto. [12, s. 74–75] DSC-kuvaajassa esitetään lämpövirtausten ero dq/dt eli teho P (W) lämpötilan funktiona. DSC-kuvaajasta voidaan määrittää näytteen entalpian muutos dH (J) integroimalla lämpövirtaus ajan t suhteen.

DSC-laitteisto koostuu DSC-moduulista, kaasuvirtausyksiköstä, jäähdytysyksiköstä ja ohjausyksiköstä. Näytteet sijoitetaan DSC-moduulin näytetarjottimelle, josta laite poimii automaattisesti näytteen kerrallaan DSC-moduulin uuniin mitattavaksi. Kaasuvirtausyksikkö säätelee DSC-moduuliin ohjattavien kaasujen, kuivaus- ja huuhtelukaasun, virtausnopeuksia. Kuivauskaasun avulla poistetaan kosteutta laitteistosta, jotta se ei vahingoittaisi laitteiston sähköllä toimivia osia. Lisäksi kuivauskaasu nopeuttaa laitteiston jäähdyttämistä. Huuhtelukaasulla luodaan uuniin inertti ympäristö ja poistetaan uunista näytteistä lämmityksen aikana vapautuvat aineet. Uuniin ohjattavana kaasuna voidaan käyttää myös reaktioon osallistuvaa kaasua kuten happea, jolloin puhutaan huuhtelukaasun sijaan reagenssikaasusta. [12, s. 91–92] Jäähdytysyksikön tehtävä on ohjata DSC-moduulin uunin jäähdytystä [12, s. 76]. Ohjausyksikön kautta hallitaan kaikkien edellä lueteltujen yksiköiden toimintaa sekä analysoidaan mittaustuloksia.

DSC-mittaukset suoritettiin Mettler Toledo DSC821e -laitteistolla. Lämmitysväli oli 10–180 °C ja lämmitysnopeus 10 °C min⁻¹. Kuivauskaasuna käytettiin 99,5 % typpikaasua ja huuhtelukaasuna 99,999 % typpikaasua. Kuivauskaasun virtausnopeus oli 60 ml min⁻¹ ja huuhtelukaasun 50 ml min⁻¹. Laitteiston kalibrointi tarkistettiin indiumnäytteellä ennen mittauksia. Laitteiston jäähdytys toteutettiin nestetyypin avulla.

Näyttekuppeina käytettiin 40 µl alumiinikuppeja, joiden kannet rei'itettiin. Näytteiden massat olivat 2,7–3,5 mg. Mikroskooppilasilla olleet amorfiset näytteet irrotettiin ja hienonnettiin varovasti spaattelilla. Näytteiden kosteudelle altistumisen minimoimiseksi valmiit näytteet säilytettiin NaOH-eksikaattorissa mittauksen alkuun asti. Kiteisistä muodoista mitattiin kaksi ja amorfisista tai osittain amorfisista muodoista kolme rinnakkaista näytettä.

7.5 Kiteytymisen seuraaminen

Indometasiinin kiteytymistä seurattiin kymmenen vuorokauden ajan kaksissa eri säilytysolosuhteissa. Seurantänäytteet valmistettiin mikroskooppilasille sulattamalla ja näytteet kuvattiin 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla näytteiden pinnalta.

Pääseurannassa valmistettiin kuusi rinnakkaista amorfista näytettä, näytteet A1–B2, joita säilytettiin lämpökaapissa 60 °C lämpötilassa NaOH-eksikaattorissa (0 % RH). Näytteet A1 ja A2 kuvattiin FLM:llä 3 h säilytyksen jälkeen ja näytteet B1 ja B2 6 h säilytyksen jälkeen. Näytteet C1 ja C2 siirrettiin lämpökaappiin vasta noin 10 h näytteiden valmistamisen jälkeen. Tätä ennen näytteet olivat olleet NaOH-eksikaattorissa huoneenlämmössä. Näytteet C1 ja C2 kuvattiin FLM:llä 12 h lämpökaapissa säilyttämisen jälkeen. Näytteiden kiteytyminen ei kuitenkaan vastannut muiden näytteiden kiteytymistä näytteiden erilaisen historian takia, joten näytteisiin C1 ja C2 liittyvät tulokset hylättiin. Näytteet A1, A2 ja B1 kuvattiin 1, 2, 3, 5, 8 ja 10 vuorokauden säilytyksen jälkeen. Mittaukset toteutettiin siten, että kaikki samalla kertaa mitattavat näytteet otettiin mittausten ajaksi pois lämpökaapista ja laitettiin mittausten jälkeen samaan aikaan takaisin lämpökaappiin. Näytteet pidettiin lämpökaapin ulkopuolellakin NaOH-eksikaattorissa, josta näytteet otettiin ulos vain FLM-mittauksen ajaksi.

Toisessa seurantatutkimuksessa valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä (D1–D3), jotka säilytettiin huoneenlämmössä eksikaattorissa, jonka pohjalla oli tislattua vettä (100 % RH). Lämpötila oli seurannan aikana $18,1 \pm 0,6$ °C. Näytteistä kaksi kuvattiin FLM:llä tuoreena. Näitä tuoreen indometasiinin FLM-kuvia käytettiin myös pääseurannan tulosten analysoinnissa. Näytteet D1 ja D3 kuvattiin 2, 5, 8 ja 10 vuorokauden säilytyksen jälkeen. Sekä huoneenlämmössä että lämpökaapissa säilytetyistä näytteistä mitattiin kymmenen vuorokauden säilytyksen jälkeen DSC-kuvaajat.

Kolmas kiteytymisen seuraamisessa käytetty menetelmä oli etanolilla aiheutettu kiteytyminen. Kiteytymistä seurattiin satakertaisesti suurentavalla öljyimmersioobjektiivilla mikroskooppilasin läpi. Mikroskooppilasilla olevan etanolipisaran päälle laitettiin alumiinipannulla valmistetusta amorfisesta indometasiinista otettu sirpale, jolloin indometasiinin kiteytyminen aiheutettiin amorfisen sirpaleen mikroskooppilasia vasten olevalla puolella. FLM kohdennettiin näytteeseen muodostuneeseen osittain kiteytyneeseen alueeseen, jota kuvattiin aluksi 10 minuutin ja myöhemmin 20 minuutin välein. Viimeinen FLM-kuva otettiin 95 minuutin kuluttua amorfisen indometasiinikappaleen lisäämisestä mikroskooppilasille.

8. TULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY

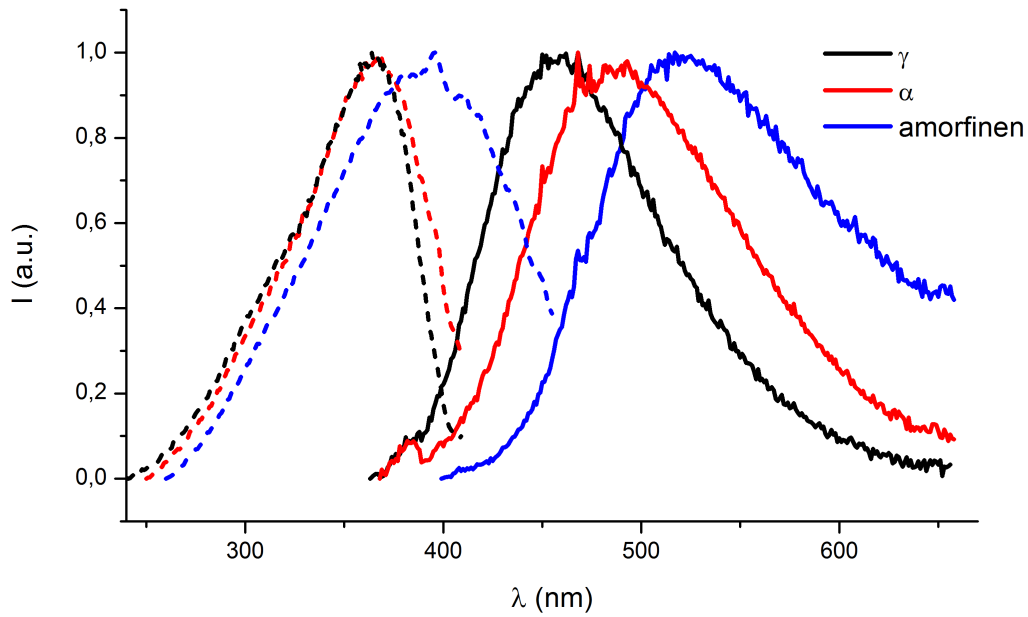
Tutkimuksessa tarkasteltiin γ - ja α -kiteisen sekä amorfisen indometasiinin stationaarisia ja aikaerotteisia fluoresenssiominaisuuksia. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, miten aikaerotteista fluoresenssia voidaan hyödyntää amorfisen indometasiinin kiteytymisen seuraamisessa. Indometasiinin kuvaamiseen elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla huomattiin liittyvän useita rajoitteita. Kiteytyminen voitiin kuitenkin havaita FLM-tulosten avulla kaikissa seurantatutkimuksissa, ja kahdessa seurannassa kolmesta FLM-tulosta voitiin tarkastella reaktiokinetiikan näkökulmasta. Seurantanäytteiden kiteytymistä arvioitiin lisäksi differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrialla.

8.1 Indometasiinin fluoresenssi

Indometasiinin fluoresenssiominaisuuksia tarkasteltiin sekä spektrofleurometrillä että elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla. Spektrofleurometrillä mitattiin γ - ja α -kiteisen sekä amorfisen indometasiinin stationaariset fluoresenssi- ja eksitaatio-spektrit. Eri muotojen aikaerotteiset fluoresenssiominaisuudet eli käytännössä fluoresenssin elinajat määritettiin elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla.

8.1.1 Stationaarinen fluoresenssi

Indometasiinin fluoresenssispektrit määritettiin viritysaallonpituudella $\lambda_{ex} = 340$ nm ja eksitaatio-spektrit mitattiin monitorointiaallonpituuksilla $\lambda_{mon,amorfinen} = 505$ nm, $\lambda_{mon,\alpha} = 480$ nm ja $\lambda_{mon,\gamma} = 460$ nm. Kiinteän indometasiinin normitetut eksitaatio- ja fluoresenssispektrit on esitetty kuvassa 8.1. Eksitaatio- ja emissiomaksimien aallonpituudet on koottu taulukkoon 8.1.



Kuva 8.1 γ - ja α -kiteisen sekä amorfisen indometasiinin normitetut eksitaatio- ja fluoresenssispektrit. Eksitaatiospektrit on esitetty katkoviivoin ja fluoresenssispektrit yhtenäisin viivoin. Eksitaatiospektrien monitorointiaallonpituudet olivat $\lambda_{\text{mon,amorfinen}} = 505 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{mon},\alpha} = 480 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon},\gamma} = 460 \text{ nm}$. Fluoresenssispektrit mitattiin viritysaallonpituudella $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$.

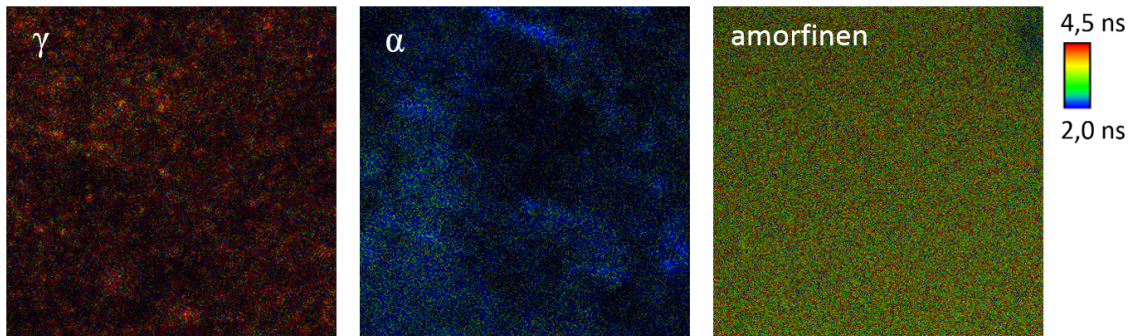
Taulukko 8.1 γ - ja α -kiteisen sekä amorfisen indometasiinille määritetyt eksitaatiomaksimien aallonpituudet $\lambda_{\text{ex,max}}$ ja emissiomaksimien aallonpituudet $\lambda_{\text{em,max}}$.

muoto	$\lambda_{\text{ex,max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em,max}}$ (nm)
γ	365	460
α	370	490
amorfinen	395	520

Kuvasta 8.1 nähdään, että γ - ja α -indometasiinin eksitaatiospektrit ovat keskenään samankaltaiset, mutta niiden fluoresenssispektrit eroavat toisistaan. α -muodon fluoresenssimaksimi on 30 nm γ -muotoa pidemmällä aallonpituudella. Amorfisen indometasiinin eksitaatio- ja emissiospektrit eroavat selvästi kiteisten muotojen vastaavista spektreistä. Fluoresenssispektrien maksimit vastaavat aiemmin saatuja tuloksia (taulukko 6.4).

8.1.2 Aikaerotteinen fluoresenssi

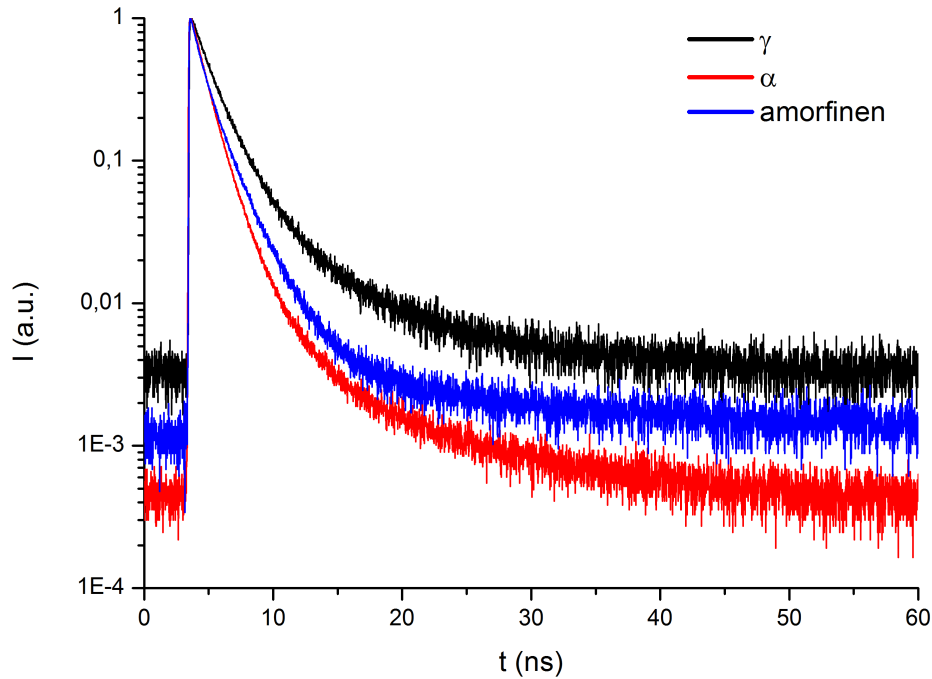
Kuvassa 8.2 on esimerkit γ - ja α -kiteisen ja tuoreen amorfisen indometasiinin intensiteettimoduloiduista FLM-kuvista. Kuvat on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmissio-objektiivilla mikroskooppilasien läpi. Kiteiset näytteet olivat jauhemaisia eivätkä jakautuneet mikroskooppilasille tasaisesti, mikä nähdään intensiteetin vaihteluna FLM-kuvissa. Amorfiset näytteet valmistettiin lasilevyille sulattamalla, jolloin näytteen kontakti mikroskooppilasiin oli parempi.



Kuva 8.2 Esimerkit γ - ja α -kiteisen sekä amorfisen indometasiinin intensiteettimoduloidusta FLM-kuvista vastaavassa järjestyksessä. Kuvat on esitetty samalla elinaikaasteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kiteisten näytteiden kuvien koko on $30 \times 30 \mu\text{m}$ ja amorfisen näytteen $40 \times 40 \mu\text{m}$. Kuvat on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmissio-objektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon}} = 430\text{--}900 \text{ nm}$. Kuvien resoluutio on $0,1 \mu\text{m}$.

FLM-kuvien perusteella γ -kiteisen, α -kiteisen ja amorfisen indometasiinin fluoresenssin elinajat eroavat toisistaan riittävästi, jotta ne voidaan erottaa toisistaan elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla ainakin laajoina, vain yhtä kidemuotoa sisältävinä pintoina. α -indometasiinin elinaika vaikuttaisi olevan pienin ja γ -indometasiinin suurin. Myös fluoresenssin intensiteetissä oli eroja: puhtaan γ -indometasiinin fluoresenssin intensiteetti oli FLM-mittauksissa selvästi heikompi kuin kahden muun muodon. Esimerkiksi kuvassa 8.2 γ - ja α -kiteisten ja amorfisen indometasiinin fluoresenssin maksimi-intensiteetit olivat 39, 135 ja 127 a.u. vastaavassa järjestyksessä. Intensiteettierot johtuvat luultavasti γ -indometasiininäytteen huonosta kontaktista mikroskooppilasiin ja siitä johtuvasta huonosta kohdentamisesta. Seurantatutkimuksessa näytteen pinnalle kiteytyneen γ -indometasiinin fluoresenssin havaittiin olevan huomattavasti amorfisen indometasiinin fluoresenssia voimakkaampi (kuva 8.21), mikä vastaa myös aiempia tuloksia. [6]

Kuvan 8.2 FLM-kuvia vastaavat normitetut fluoresenssin vaimenemisen kuvaajat on esitetty kuvassa 8.3. Fluoresenssin vaimenemiskuvaajien muoto vastasi parhaiten kaksiekspotentiaalista vaimenemista. Todellisuudessa kyseessä on todennäköisesti



Kuva 8.3 Kuvan 8.2 FLM-kuvia vastaavat γ - ja α -kiteisen sekä amorfisen indometasiinin normitetut fluoresenssin vaimenemiskuvaajat. γ - ja α -indometasiinin vaimenemiskuvaajat määritettiin koko kuvan alueelta ja amorfisen indometasiinin noin $15 \times 15 \mu\text{m}$ alueelta. Vaimenemiskuvaajat mitattiin aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900 \text{ nm}$.

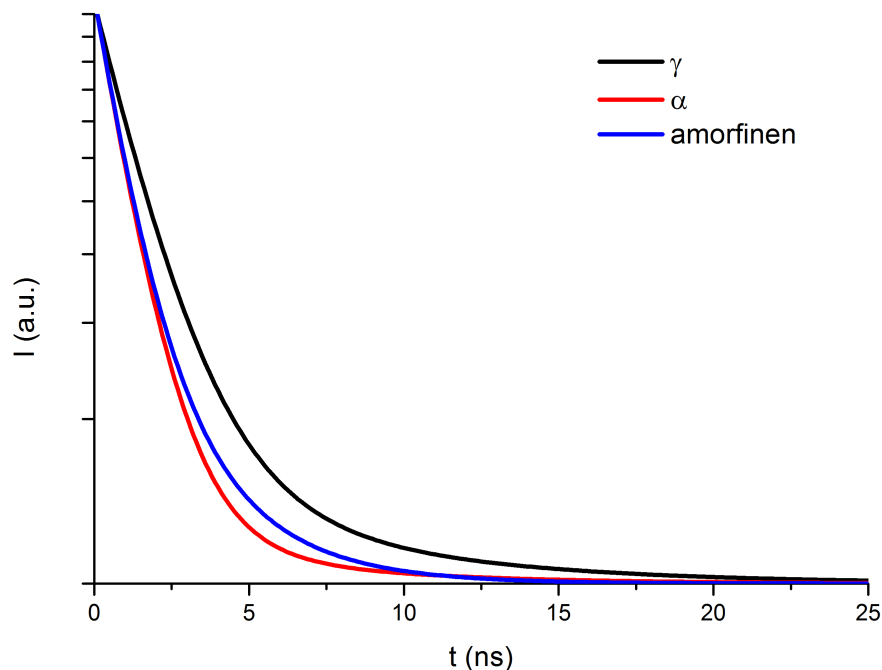
ei-eksponentiaalinen vaimeneminen, koska kiinteissä näytteissä molekyylien välillä on aina vuorovaikutuksia. Indometasiinille määritetyt elinajat τ_1 ja τ_2 , niiden suhteelliset osuudet sekä keskimääräinen elinaika τ_{av} on esitetty virherajoineen taulukossa 8.2. Kiteisten näytteiden elinaika määritettiin kymmenestä saman näytteen eri kohdista otetusta $30 \times 30 \mu\text{m}$ FLM-kuvasta. Elinajasovitus tehtiin koko kuvan alueelta määritettyyn vaimenemiskuvaajaan. Amorfisen indometasiinin elinaika määritettiin viidestä erillisestä näytteestä, joista jokaisesta oli otettu kaksi FLM-kuvaa eri kohdista. Vaimenemiskuvaaja määritettiin kuvista $10 \times 10 \mu\text{m} - 15 \times 15 \mu\text{m}$ alueelta, jolloin elinajasovituksen virhe jäi pieneksi.

Taulukko 8.2 γ -kiteisen, α -kiteisen ja amorfisen indometasiinin fluoresenssin elinajat τ_1 ja τ_2 , niiden suhteelliset osuudet sekä keskimääräiset elinajat τ_{av} virherajoineen.

muoto	τ_1 (ns)	osuus (%)	τ_2 (ns)	osuus (%)	τ_{av} (ns)
γ	$1,66 \pm 0,02$	$93,2 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,6$	$2,64 \pm 0,06$
α	$1,19 \pm 0,01$	$97,2 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$1,64 \pm 0,04$
amorfinen	$1,07 \pm 0,06$	79 ± 2	$2,7 \pm 0,2$	21 ± 2	$1,75 \pm 0,04$

Tulosten perusteella γ - ja α -kiteisellä sekä amorfisella indometasiinilla on muodolle tyypilliset fluoresenssin elinajat ja elinaikojen osuudet. Amorfinen muoto eroaa selkeästi kummastakin kiteisestä muodosta elinajan τ_2 ja elinaikojen osuuksien perusteella. Kiteisillä muodoilla τ_2 on 5–6 ns, kun taas amorfisella indometasiinilla $\tau_2 < 3$ ns. Amorfisella indometasiinilla lyhyemmän elinajan osuus on noin 80 % ja kiteisillä muodoilla vastaava osuus on yli 90 %. Lyhyemmät elinajat τ_1 ovat lähellä toisiaan kaikilla muodoilla. Keskimääräiset elinajat noudattavat FLM-kuvien (kuva 8.2) järjestystä: τ_{av} on pienin α -indometasiinilla ja suurin γ -indometasiinilla, vaikkakin amorfisen ja α -indometasiinin keskimääräiset elinajat ovat lähellä toisiaan. Elinajat poikkeavat toisistaan kuitenkin selvästi vähemmän kuin FLM-kuvien perusteella voisi odottaa. Pidempi elinaika vaikuttaisi korostuneen amorfisen ja γ -indometasiinin FLM-kuvissa, mutta ei α -indometasiinin FLM-kuvissa.

Kokeellisissa vaimenemiskuvaaajissa on mukana jonkin verran taustaa, jonka takia kuvan 8.3 vaimenemiskuvaaajien pohjaviiva ei ole nollassa vaan vaihtelee mittausten välillä ja kokeellisia kuvaajia on vaikea verrata keskenään. Kuvassa 8.4 on esitetty taulukon 8.2 arvoista indometasiinin eri muotojen fluoresenssille lasketut vaimene-



Kuva 8.4 γ - ja α -kiteisen sekä amorfisen indometasiinin laskennalliset vaimenemiskuvajaat. Kuvaajat on laskettu elinaikojen ja niiden suhteellisten osuuksien keskiarvoista, jotka on esitetty taulukossa 8.2.

miskuvaajat, jotka on laskettu sijoittamalla elinajat ja niiden suhteelliset osuudet yhtälöön 5.11. Laskennallisten vaimenemiskuvaajien muodot ovat keskenään erilaisia, mutta elinaikojen kokeellisen määrittämisen kannalta kuvaajat ovat lähellä toisiaan. Käytännössä se tarkoittaa, että indometasiinin muodot voi olla vaikea erottaa toisistaan tilanteissa, joissa samassa näytteessä on läsnä useampaa indometasiinin muotoa.

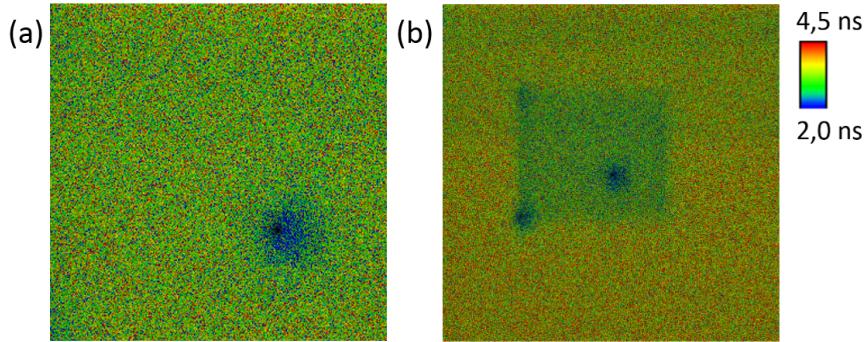
8.2 Indometasiinin FLM-kuvaukseen liittyvät rajoitteet

Kiinteän indometasiinin kuvaamiseen elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla liittyi useita rajoitteita. Näytteet vahingoittuivat, jos viritysväloin intensiteetti oli suuri tai yksittäiset mittauspisteet olivat lähellä toisiaan. Myös mikroskoopin kohdentaminen kuvattavaan tasoon kiinteiden näytteiden epätasaiselle pinnalle tuotti vaikeuksia. Kohdentaminen oli erityisen hankalaa, kun kiinteitä näytteitä kuvattiin öljyimmersio-objektiivilla mikroskooppilasin läpi. Näytteiden käsittelyyn liittyvien ongelmien lisäksi indometasiinin eri muotojen samankaltaisen fluoresenssin aikariippuvuuden takia kiteytymisen varhaisia vaiheita ei voitu tunnistaa FLM-kuvista.

8.2.1 Valoherkkyys

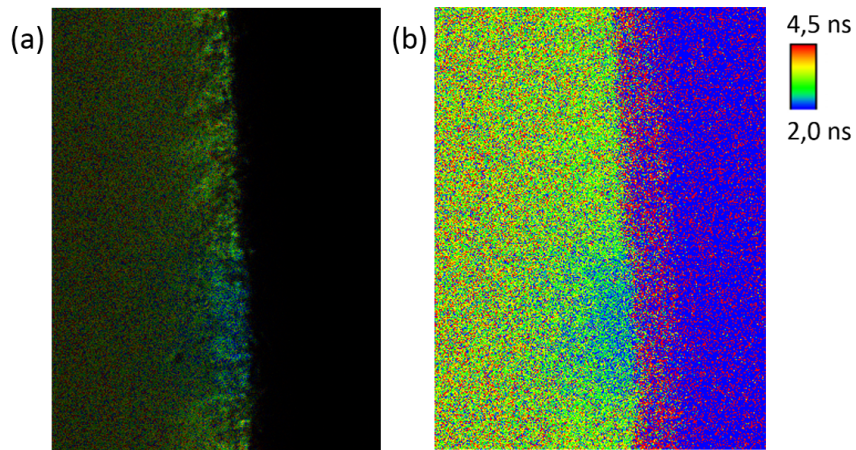
Indometasiinin huomattiin olevan herkkä virittävän väloin intensiteetille. Kuvissa 8.5 ja 8.6 on esitetty kaksi tapausta, joissa näytettä on vahingoitettu viritysväloilla. Kuvassa 8.5 on kaksi 129 a.u. viritysintensiteetillä kuvattua intensiteettimoduloitua FLM-kuvaa mikroskooppilasilte valmistetusta amorfisesta näytteestä. Kuvat on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla. Kuvan 8.5(a) koko on $30 \times 30 \mu\text{m}$ ja kuvan 8.5(b) $80 \times 80 \mu\text{m}$. Pienempi kuva otettiin ensin, jonka jälkeen kuvattiin näytettä liikuttamatta koko FLM:n kuvausalue. Ensimmäinen kuva erottuu toisessa kuvassa sinertävänä suorakulmiona. Jälkimmäisen kuvan ottamisen jälkeen intensiteetti pienennettiin puoleen ja sama alue kuvattiin uudelleen noin 15 minuutin kuluttua. Sinertävä alue pysyi muuttumattomana, joten alueen pääteltiin vahingoittuneen virittävästä välosta. Viritysväloin intensiteetin ollessa 30 a.u. näytteen ei havaittu enää vahingoittuvan, joten tätä intensiteettiä käytettiin jatkossa viritysintensiteettinä.

Kuvassa 8.5 nähdään myös näytteen kohdistamisen aikana viritysväloin vahingoittama pieni alue $80 \times 80 \mu\text{m}$ mittausalueen keskellä. Videomonitoroinnin avulla kohdistamista seuratta näytteeseen päästetään hetkellisesti mittaussintensiteettiä suurempi intensiteetti. Vaikka mikroskooppi kohdennettiin ensin näytteen viereen mik-



Kuva 8.5 Liian suurella viritysvaon intensiteetillä vahingoitettu mikroskooppilasille valmistettu amorfinen näyte. Kuva (a) ($30 \times 30 \mu\text{m}$, resoluutio $0,1 \mu\text{m}$) on otettu ensin. Tämän jälkeen näyte kuvattiin laajemmalla ($80 \times 80 \mu\text{m}$, resoluutio $0,16 \mu\text{m}$) alueelta näytettä siirtämättä, mikä on esitetty kuvassa (b). Molemmat kuvat ovat intensiteettimoduloituja ja esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty oikealla. Näytteet on kuvattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon}} = 430\text{--}900 \text{ nm}$.

roskooppilasille, jonka jälkeen intensiteetti pienennettiin mittauksissa käytettyyn arvoon ennen kuin näytettä altistettiin viritysvaololle ja varsinainen näytteeseen kohdistaminen tehtiin nopeasti, FLM:n mittausalueen keskellä oleva alue vahingoittui. Näytteen vahingoittuminen vältettiin, kun mikroskooppi kohdistettiin näytteeseen okulaarin läpi silmämääräisesti arvioiden.

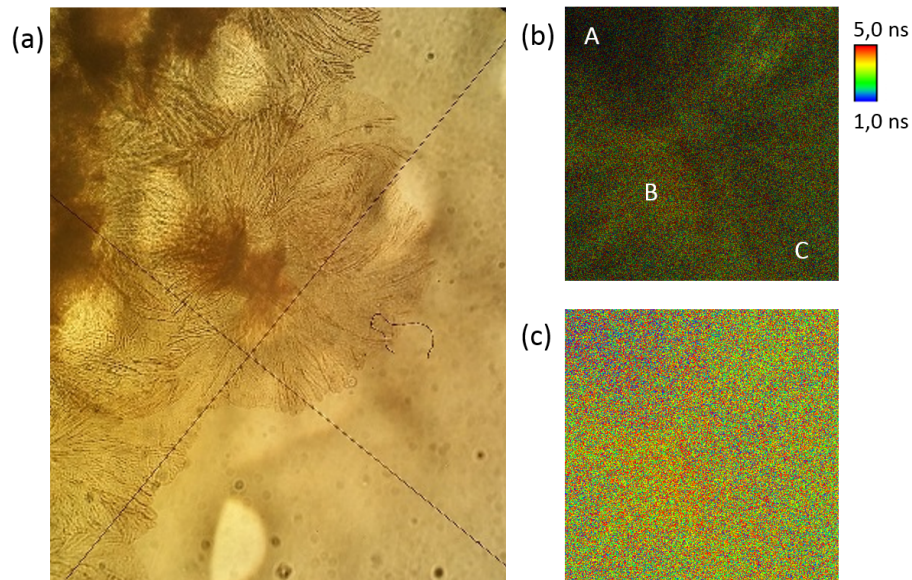


Kuva 8.6 Liian suurella kuvausresoluutiolla vahingoitettu amorfinen näyte. Kuvassa erottuva sinertävä alue on kuvattu $0,02 \mu\text{m}$ resoluutiolla ennen tässä esitetyn FLM-kuvan ottamista. Sama FLM-kuva on esitetty intensiteettimoduloituna (a) ja ilman intensiteettiä (b). Elinaika-asteikko on esitetty kuvassa oikealla. Näytteet on kuvattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon}} = 430\text{--}900 \text{ nm}$. Kuvien koko on $30 \times 40 \mu\text{m}$ ja resoluutio $0,1 \mu\text{m}$.

Myös kuvan 8.6 tapauksessa kuva on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla, mutta tällä kertaa 30 a.u. viritysintensiteetillä. Ennen kuvan 8.6 ottamista näytettä on kuvattu kiteytymään alkaneelta reunalta $10 \times 10 \mu\text{m}$ alueelta $0,02 \mu\text{m}$ resoluutiolla. Aiemmin kuvattu alue erottuu kuvassa 8.6 selvästi sinertävänä alueena eli lyhyemmän elinajan alueena erityisesti ilman intensiteettimodulointia esitetyssä kuvassa. Fluoresenssin intensiteetissä ei ole kuitenkaan selkeää eroa. Näytteiden ei havaittu vahingoittuvan yleensä käytetyillä $0,1 \mu\text{m}$ ja $0,2 \mu\text{m}$ resoluutiolla.

8.2.2 Kiteytymisen alkuvaihe

Kuvassa 8.7 on esitetty esimerkki, miten kiteytymisen alkuvaihe erottui FLM-kuvissa. Kuvassa on valomikroskooppikuva, intensiteettimoduloitu FLM-kuva ja FLM-kuva esitettynä ilman intensiteettiä. Kuvat on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla näytteiden pinnalta. Valomikroskooppikuva on otettu laajemmalta alueelta kuin FLM-kuva, jotta kiteytyminen näkyisi kuvassa selkeästi. FLM-kuva on otettu valomikroskooppikuvan keskellä olevalta tummalta alueelta, joka on hieman kohdennusviivojen leikkauspisteen yläpuolella. Intensiteettimoduloituun FLM-kuvaan on merkitty toisistaan jonkin verran eroavat alueet *A*, *B* ja *C*, joille lasketut elinajat on esitetty taulukossa 8.3.



Kuva 8.7 Samasta alueesta kiteytymisen alkuvaiheessa otettu valomikroskooppikuva (a), intensiteettimoduloitu FLM-kuva (b) ja FLM-kuva ilman intensiteettiä (c). FLM-kuvien elinaja-asteikko on esitetty kuvassa oikealla ja se on sama molemmissa kuvissa. FLM-kuvien koko on $80 \times 80 \mu\text{m}$ ja resoluutio $0,2 \mu\text{m}$. Näytteet on kuvattu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon}} = 430\text{--}900 \text{ nm}$.

Taulukko 8.3 Osittain pinnalta kiteytyneen näytteen FLM-kuvan 8.7(b) eriväristen alueiden A , B ja C elinajat τ_1 ja τ_2 sekä elinaikojen suhteelliset osuudet.

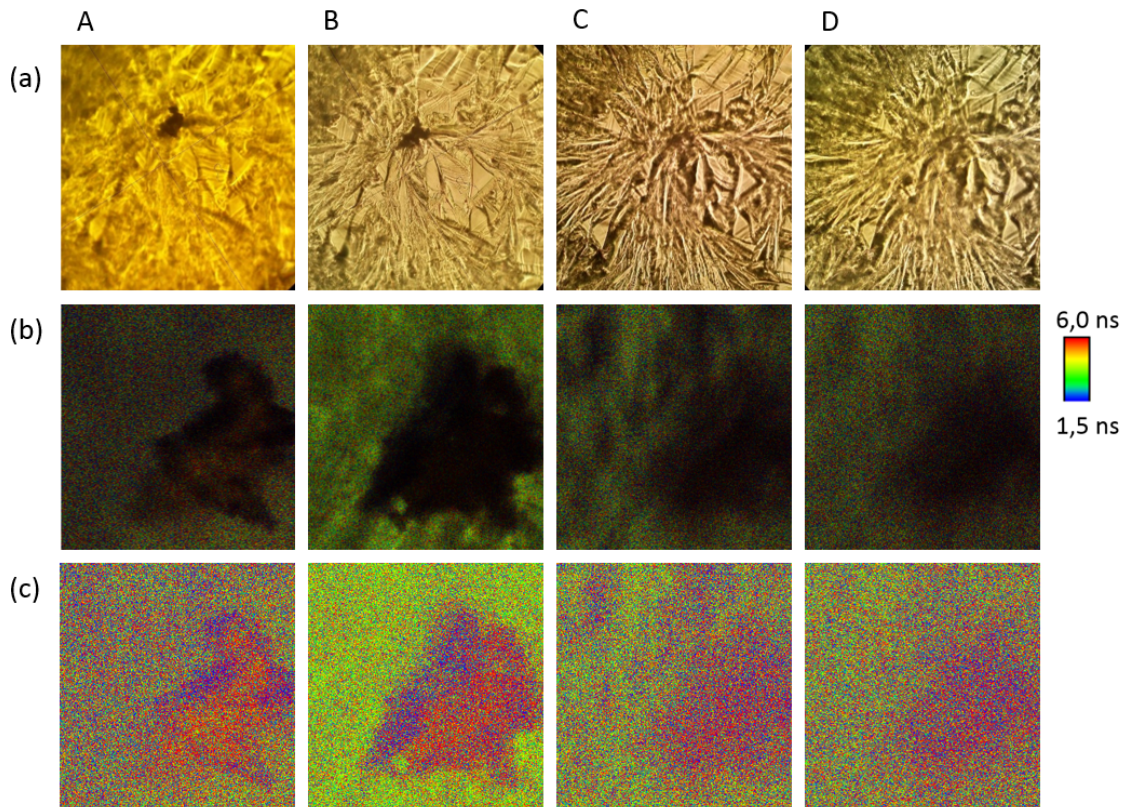
alue	τ_1 (ns)	osuus (%)	τ_2 (ns)	osuus (%)
A	0,89	73,3	2,44	26,7
B	1,04	78,0	2,97	22,0
C	0,95	78,8	2,69	21,2

Kuvassa 8.7(a) näkyvät soikeat vaaleat pisarat ovat mikroskooppilasin toisella puolella olevaa immersioöljyä, joka on peräisin aiemmista mittauksista. Valomikroskooppikuvasta nähdään, että näyte on alkanut kiteytyä ohuena, läpikuultavana kerroksena ja kiteytyneen alueen keskellä on tiiviimpi ydinalue. Fluoresenssin elinaikojen mukaan (taulukko 8.3) koko alue on kuitenkin yhä amorfinen, vaikka arvoissa onkin hieman vaihtelua kuvan sisällä. Vaikka FLM:n kuvaama fluoresenssisignaali saadaan osittain pinnalla olevasta kiteisestä kerroksesta, kiteytynyt kerros on kuitenkin hyvin ohut ja valtaosa fluoresenssisignaalista näyttäisi tulevan kiteisen pinnan alla olevasta amorfisesta indometasiinista.

8.2.3 Kohdentaminen

Pinnalta epätasaisiin kiinteisiin näytteisiin kohdentaminen vaikutti kuvien tarkkuuteen. Kuvassa 8.8 on esitetty esimerkki, miten kohdentamisen vaikutukset havaittiin FLM-kuvissa. Kuvat on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla kolme vuorokautta 60 °C lämpötilassa 0 % RH:ssa säilytetystä amorfisesta näytteestä. Näytteessä erottui tiivis, kiteinen alue, minkä lisäksi näytteen pinta näyttäisi olevan ohuen kiteisen kerroksen peittämä. Näytettä kuvattiin neljällä eri kohdennusetaisyydellä A – D , jotka on esitetty kuvassa 8.8 pystyriveittäin. Ylimmällä vaakarivillä (a) on esitetty valomikroskooppikuvat näytteestä, keskimmaisella rivillä (b) intensiteettimoduloidut FLM-kuvat ja alimmalla rivillä (c) FLM-kuvat ilman intensiteettiä kullakin kohdennustasolla.

Kuvan 8.8 A -sarakkeen kuvissa mikroskooppi on kohdistettu näytteessä olleeseen läpinäkymättömään alueeseen näytteen sisälle. B -sarakkeen kuvissa kohdentaminen on tehty siten, että sekä läpinäkymätön alue että oletettavasti näytteen pinnalla oleva kiteinen kuvio näkyivät okulaarissa terävästi. C -sarakkeen kuvat on kohdistettu time trace -signaalin avulla, ja D -sarakkeen kuvat on kohdennettu etäisyydelle, jossa läpinäkymätön alue ei enää erottunut mikroskoopin okulaarissa. Kohdennusetaisyyksiä arvioitiin tarkennuspyörän hienosäätöasteikon avulla: B on kohdennettu 19 μm , C 40 μm ja D 46 μm etäisyydelle kuvan A kohdentamistasosta.



Kuva 8.8 Valomikroskooppikuva (a), intensiteettimoduloitu FLM-kuva (b) ja FLM-kuva ilman intensiteettiä (c) neljällä eri kohdennusetasuudella A–D. FLM-kuvat on esitetty samalla elinaja-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. FLM-kuvien koko on $80 \times 80 \mu\text{m}$ ja resoluutio $0,2 \mu\text{m}$. Näytteet on kuvattu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon}} = 430\text{--}900 \text{ nm}$.

FLM-kuvien yläreunassa olevien vihertävien alueiden elinajat osuuskineen, $\tau_1 = 1,21\text{--}1,25 \text{ ns}$ (85–89 %) ja $\tau_2 = 3,5\text{--}3,9 \text{ ns}$ (11–15 %), olivat melko lähellä toisiaan kohdennusetasuudesta riippumatta. Taulukkoon 8.4 on koottu ilman intensiteettimodulointia esitetyissä FLM-kuvissa 8.8(c) esiintyvältä punertavalta, kiteiseksi oletetulta alueelta lasketut elinajat τ_1 ja τ_2 sekä niiden suhteelliset osuudet. Kummankaan alueen elinajat osuuskineen eivät yksiselitteisesti vastaa amorfista tai kumpaakaan kiteistä indometasiinia. Koska indometasiinin eri muotojen vaimenemiskuvauajat ovat lähellä toisiaan, fluoresenssin aikariippuvuudesta ei voida erottaa erikseen kiteisen ja amorfisen indometasiinin elinaikoja vaan elinajat ja niiden suhteelliset osuudet muuttuvat suhteessa kiteisen indometasiinin osuuteen. Vihertävän alueen elinajat ja elinaikojen osuudet ovat punertavan alueen elinaikoja lähempänä amorfisen indometasiinin elinaikoja, mikä viittaa alueella olevan vähemmän kiteistä indometasiinia. Vastaavasti taulukossa 8.4 esitetyt arvot ovat lähempänä kiteisen indometasiinin arvoja, joten punertavalla alueella on enemmän kiteistä indometasiinia kuin vihertävillä alueilla.

Taulukko 8.4 Samasta näytteestä eri kohdennustasoilla A – D määritetyt kiteisen alueen elinajat τ_1 ja τ_2 sekä niiden suhteelliset osuudet. Elinajat on määritetty kuvien 8.8(c) punertavilta alueilta.

kohdennus	τ_1 (ns)	osuus (%)	τ_2 (ns)	osuus (%)
A	1,48	89,4	5,87	10,6
B	1,41	89,8	5,29	10,2
C	1,34	87,6	4,44	12,4
D	1,35	89,4	4,54	10,6

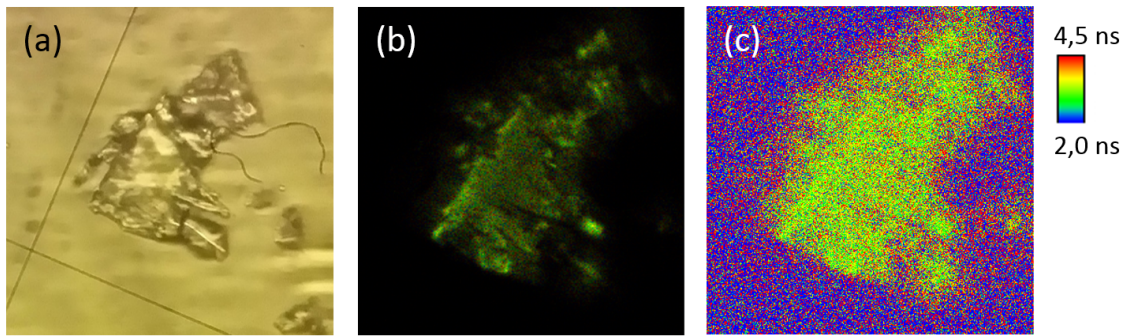
Taulukon 8.4 mukaan kiteisemmän alueen elinajat eroavat toisistaan eri kohdennustasoilla mutta elinaikojen osuudet pysyvät lähes samoina. Kohdennustason A elinajat vastaavat parhaiten kiteisen indometasiinin elinaikoja ja kohdennustason C vastaavat niitä huonoiten. Kiteisen alueen yläpuolella vaikuttaisi olevan vielä ohut amorfien kerros, jonka fluoresenssi vaikuttaa havaittuun fluoresenssiin. Koska näyte ei ole pystysuunnassa tasalaatuinen, myös näytteen fluoresenssi eroaa eri kohdennustasojen välillä.

Kiteisen alueen fluoresenssin intensiteetti on heikko, vaikka γ -kiteisen indometasiinin fluoresenssi on voimakkaampaa kuin amorfisen indometasiinin fluoresenssi. Maksimi-intensiteetti kohdennuksella A on 34 a.u., B 65 a.u., C 41 a.u. ja D 37 a.u., eli kuvassa B on suurin fluoresenssin intensiteetti. Sekä FLM-kuvien tarkkaroajaisuuden että fluoresenssin intensiteetin perusteella kohdentaminen on onnistunut parhaiten kohdennusetaisytydellä B , mutta kiteisen indometasiinin fluoresenssi on saatu mitattua parhaiten etäisyydellä A . Läpinäkymätön ja kiteinen alue on hieinan näytteen pinnan alapuolella, joten läpinäkymättömään alueeseen kohdentaessa (etäisyys A) osa fluoresenssista absorboituu alueen yläpuolella olevaan amorfiseen aineeseen ja detektorille pääsevä signaali on heikko. Tässä tapauksessa time trace -signaalin avulla (etäisyys C) mikroskooppi kohdennettiin liian kauas näytteen pinnasta, jolloin fluoresenssin intensiteetti oli selvästi heikompi ja kuva epätarkempi. Samoin myös kohdennusetaisytydellä D mikroskooppi on kohdennettu liian kauas näytteen pinnasta.

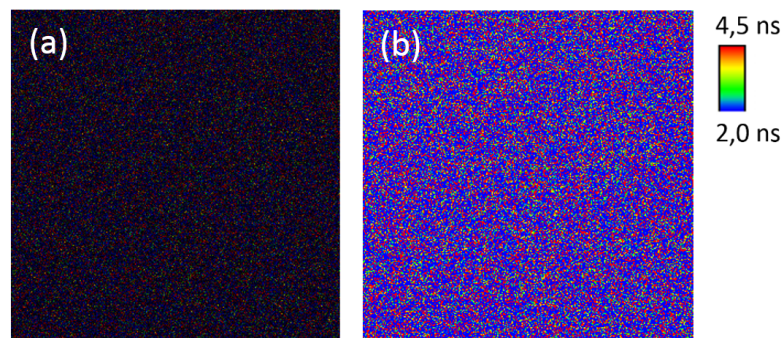
8.2.4 Kontaktiongelmat

Öljyimmersio-objektiivilla kuvattaessa näytteiden asettaminen mikroskooppilasille vaikeutti kohdentamisen onnistumista. Kiinteillä näytteillä mikroskooppilasin ja näytteen väliin jää helposti ilmaa, jolloin FLM-kuvista tulee epätarkkoja. Huonosta kontaktista on esitetty esimerkit kuvissa 8.9 ja 8.10. Molemmissa kuvissa näytteenä on ollut alumiinipannulla valmistetun amorfisen indometasiinilevyn kappale, joka

on asetettu mikroskooppilasille. Indometasiinikappaleeseen oli tarttunut pieniä sirpaleita, minkä takia pinta ei ollut tasainen ja mikroskooppia ei saatu kohdennettua varsinaiseen näytteeseen. Kuvassa 8.9 mikroskooppi on kohdennettu näytteen ja lasin välissä olevaan sirpaleeseen. Kuvassa on esitetty valomikroskooppikuva, intensiteettimoduloitu FLM-kuva ja FLM-kuva ilman intensiteettiä samasta alueesta. Kuvassa 8.10 on esitetty intensiteettimoduloitu FLM-kuva ja FLM-kuva ilman intensiteettiä amorfisesta kappaleesta kohdasta, jossa ei lasin ja näytteen välissä havaittu irtonaisia sirpaleita. Näytteen kontakti lasilevyyn on kuitenkin ollut huono, minkä seurauksena fokusointi näytteeseen ei ole onnistunut ja havaittu fluoresenssin intensiteetti on ollu heikko.



Kuva 8.9 Valomikroskooppikuva (a), intensiteettimoduloitu FLM-kuva (b) ja FLM-kuva ilman intensiteettiä (c) näytteen ja mikroskooppilasin välissä olevasta sirpaleesta. Kuvat on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla. FLM-kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty oikeassa reunassa. FLM-kuvien koko on $35 \times 35 \mu\text{m}$, resoluutio $0,1 \mu\text{m}$ ja mittausaallonpituudet $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon}} = 430\text{--}900 \text{ nm}$.



Kuva 8.10 Esimerkki näytteen huonosta kontaktista mikroskooppilasiin: intensiteettimoduloitu FLM-kuva (a) ja FLM-kuva ilman intensiteettiä (b) amorfisesta kappaleesta mikroskooppilasin päällä. FLM-kuvan koko on $30 \times 30 \mu\text{m}$ ja resoluutio $0,1 \mu\text{m}$. Elinaika-asteikko on esitetty oikeassa reunassa. Näyte on kuvattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla mittausaallonpituuksilla $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{\text{mon}} = 430\text{--}900 \text{ nm}$.

Taulukkoon 8.5 on koottu kuvien 8.9 ja 8.10 vaimenemiskuvaaajista määritetyt fluoresenssin elinajat ja niiden suhteelliset osuudet. Kuvasta 8.9 elinajat määritettiin sekä sirpaleesta että kuvan reunalta. Kuvan 8.10 elinaika on määritetty koko kuvan alueelta.

Taulukko 8.5 FLM-kuvista, joissa amorfisen näytteen kontakti mikroskooppilasiin on ollut huono, määritetyt fluoresenssin elinajat τ_1 ja τ_2 sekä niiden suhteelliset osuudet. Elinajat määritettiin kuvasta 8.9 kuvassa olevasta sirpaleesta sekä sen ympäriltä ja kuvasta 8.10 koko kuvan alueelta.

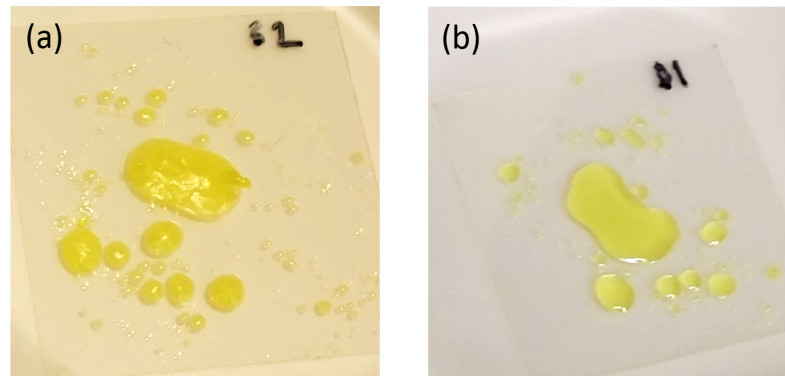
alue	τ_1 (ns)	osuus (%)	τ_2 (ns)	osuus (%)
Kuva 8.9:				
sirpale	1,02	75,7	2,61	24,3
reuna	0,92	64,8	2,30	35,2
Kuva 8.10	1,02	74,3	2,58	25,7

Taulukon 8.5 elinajat ja elinaikojen suhteelliset osuudet vastaavat amorfiselle indometasiinille määritettyjä arvoja, joskin sirpaleen reunalta määritetyt arvot poikkeavat selvästi kahdesta muusta alueesta. Vaikka kuvista voidaan laskennallisesti tunnistaa näyte amorfiseksi, kuvat itsessään eivät ole kovin informatiivisia eikä niistä luultavasti voisi erottaa pieniä alueita, joissa on erilaiset fluoresenssin elinajat.

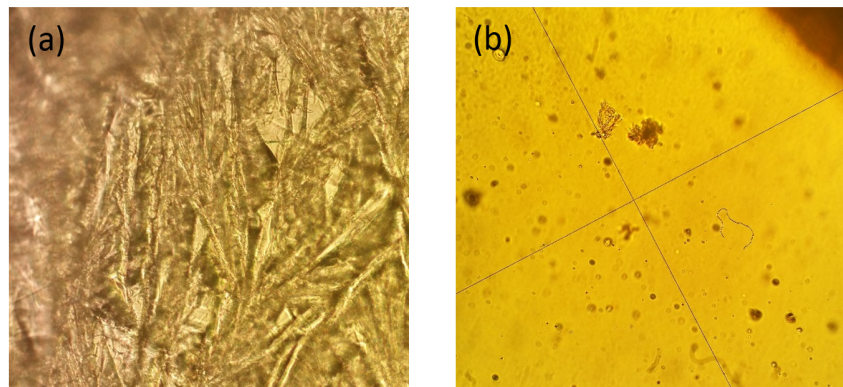
Kiinteiden näytteiden kuvaaminen onnistui paremmin ilmaobjektiivilla, jolla näytettä kuvattiin suoraan näytteen pinnalta. Ilmaobjektiivia käytettäessä näyte kiinnitetään mikroskoopin näytepidikkeeseen ylösalaisin, joten näyte täytyy kiinnittää mikroskooppilasiin. Näytteiden ylösalaisin kiinnittäminen voi tuottaa vaikeuksia jauhe-
maisten näytteiden mittaamisessa. Amorfisten ja osittain kiteytyneiden näytteiden kuvaaminen ilmaobjektiivilla onnistui kuitenkin hyvin. Kun amorfinen näyte valmistettiin sulattamalla indometasiinia mikroskooppilasille, näyte kiinnittyi tiiviisti mikroskooppilasiin ja näytettä voitiin kuvata sekä öljyimmersio-objektiivilla että ilmaobjektiivilla. Kiteytymistä ei kuitenkaan havaittu näytteiden mikroskooppilasia vasten olevalla pinnalla, jota öljyimmersio-objektiivilla kuvataan, joten seurantatutkimuksessa näytteet kuvattiin ilmaobjektiivilla.

8.3 Kiteytymisen seuranta

Kiteytymistä seurattiin elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla kymmenen vuorokauden ajan kaksissa eri säilytysolosuhteissa, 60 °C lämpötilassa 0 % RH:ssa ja huoneenlämmössä 100 % RH:ssa. Kuvassa 8.11 on esitetty valokuvat esimerkkinäytteistä säilytysjakson lopussa, ja kuvassa 8.12 on esitetty valomikroskoopikuvat



Kuva 8.11 Seurantanäytteet mikroskooppilevyllä kymmenen vuorokauden säilytyksen jälkeen. Näyte (a) on ollut lämpökaapissa 60°C lämpötilassa 0 % RH:ssa ja näyte (b) huoneenlämmössä 100 % RH:ssa.



Kuva 8.12 Valomikroskooppikuvat seurantanäytteistä kymmenen vuorokauden säilytyksen jälkeen. Näytettä (a) on säilytetty lämpökaapissa 60°C lämpötilassa 0 % RH:ssa ja näytettä (b) huoneenlämmössä 100 % RH:ssa. Kuvat on otettu 40-kertaisesta suurentavalla ilmaobjektivilla.

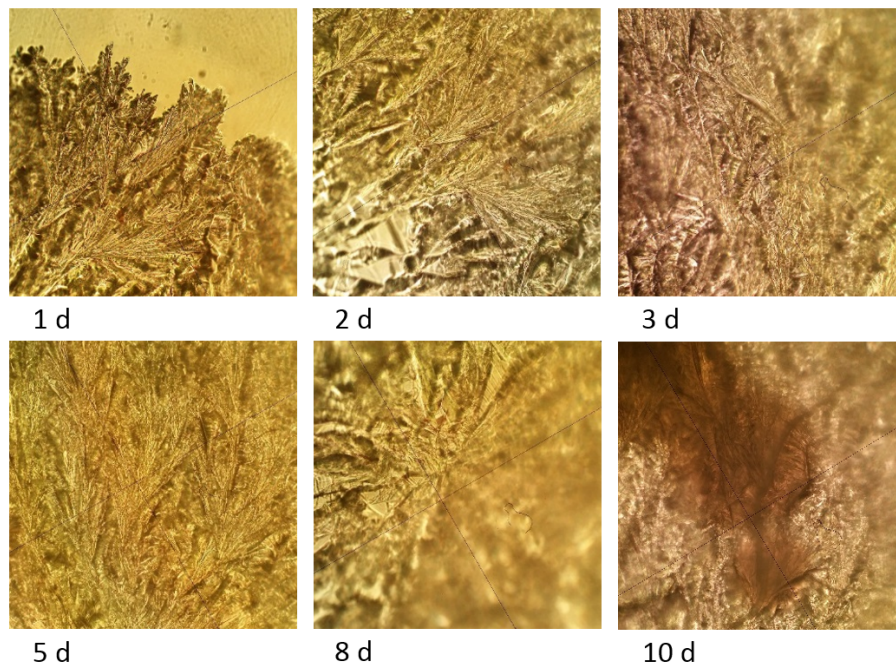
vastaavista näytteistä. Näytteet olivat säilytyksen lopussa molemmissa säilytysolosuhteissa vielä keltaisia, mutta lämpökaapissa säilytettyjen näytteiden pinta oli selvästi samentunut. Huoneenlämmössä säilytetyt näytteet eivät olleet silmämääräisesti tarkastellen juuri muuttuneet säilytyksen aikana, mutta näytteiden reunat olivat kuitenkin muuttuneet hieman valkoisiksi.

Valomikroskooppikuvissa (kuva 8.12) näytteet sen sijaan eroavat selvästi toisistaan. Lämpökaapissa säilytettyjen näytteiden pinnat olivat kauttaaltaan kiteytyneen kerroksen peittämät, kun taas huoneenlämmössä säilytettyjen näytteiden pinta oli pääosin yhä läpikuultava, mutta näytteisiin oli syntynyt pieniä, kuplia muistuttavia kiteisiä alueita. Näytteiden ulkonäön perusteella amorfinen indometasiini kiteytyy osittain kymmenessä päivässä molemmissa säilytysolosuhteissa. Lämpökaapissa säilytettyjen näytteiden kiteytyminen on kuitenkin edennyt nopeammin.

Kymmenen päivän seurantatutkimusten lisäksi elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla seurattiin amorfisen indometasiinin etanolilla aiheutetun kiteytymisen etenemistä. Etanolilla aiheutettu kiteytyminen eteni nopeasti eikä näytettä jouduttu siirtämään mittauskertojen välissä, joten kiteytymisen edetessä voitiin seurata myös fluoresenssin elinaikajakauman muutosta.

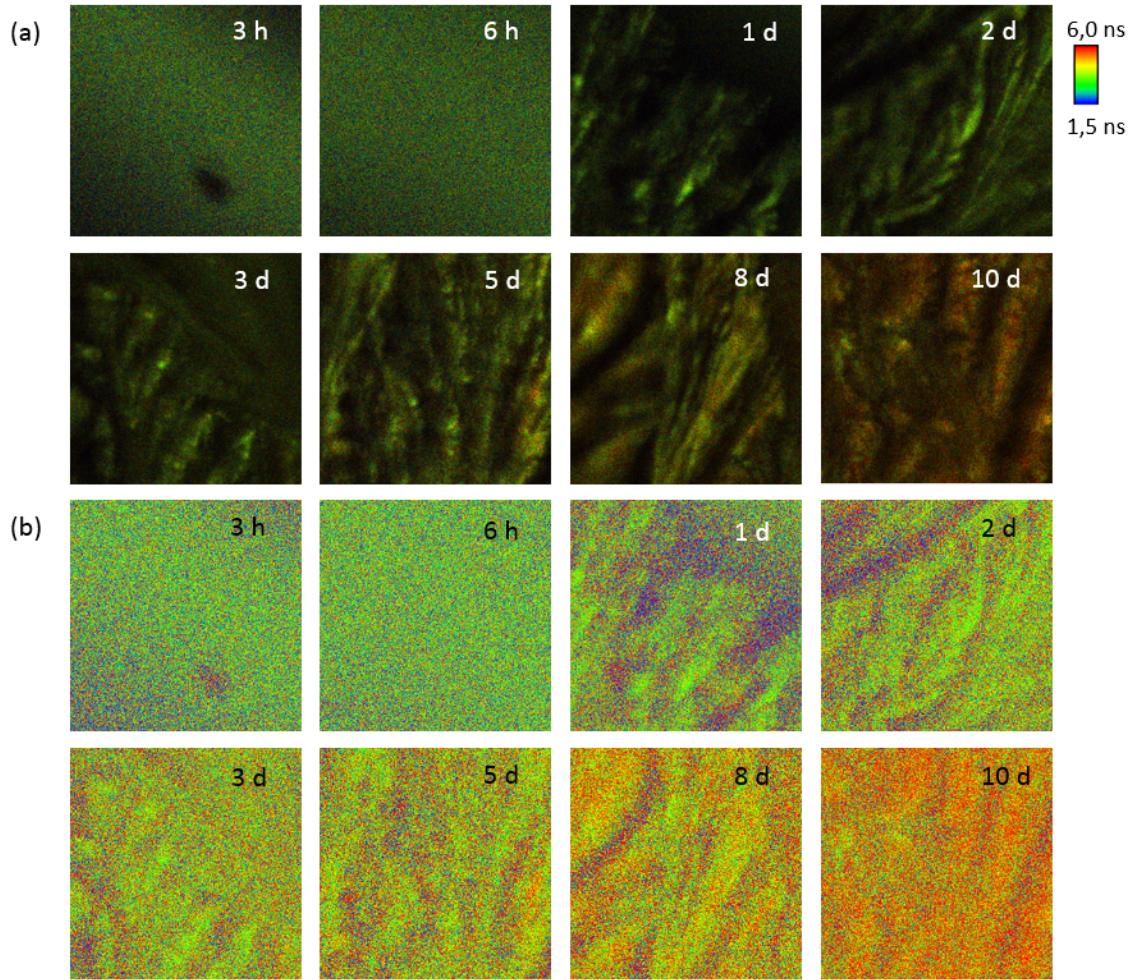
8.3.1 Kiteytyminen lämpökaapissa

Lämpökaapissa säilytettyjen näytteiden pinta peittyi nopeasti kiteisellä kerroksella. Kuvassa 8.13 on esitetty esimerkit valomikroskooppikuvista säilytyksen eri vaiheissa. Kuuden tunnin säilytyksen jälkeen (ei esitetty kuvassa) näytteet eivät juuri poikenneet tuoreista amorfisista näytteistä. Ensimmäisen vuorokauden säilytyksen aikana näytteiden pinnalle oli kuitenkin kasvanut kukkamaisia kiteisiä alueita, jotka peittivät ison osan amorfisten pisaroiden pinnasta. Näytteistä kuvattavaksi valitut alueet olivat okulaarin kautta arvioiden kokonaan kiteytyneet pinnalta kahden vuorokauden säilytyksen jälkeen. Näytteet samentuivat säilytyksen edetessä jonkin verran, mutta muuten näytteissä ei näkynyt okulaarin kautta tarkasteltaessa suuria muutoksia ensimmäisen kahden vuorokauden säilytyksen jälkeen.



Kuva 8.13 Valomikroskooppikuvat lämpökaapissa 60 °C 0 % RH:ssa säilytetystä amorfisesta indometasiinista 1, 2, 3, 5, 8 ja 10 vuorokauden säilytyksen jälkeen. Kuvat on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla.

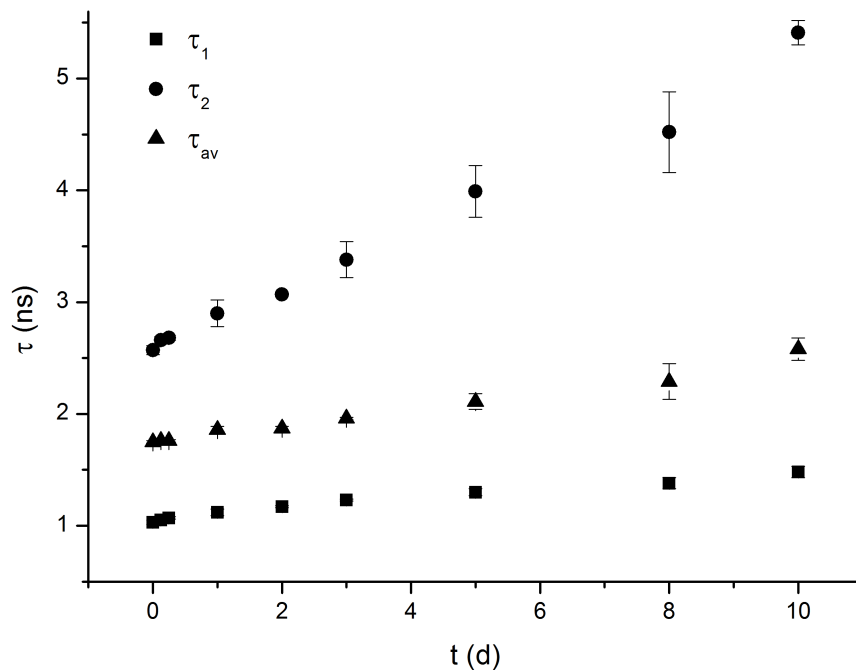
Kuvassa 8.14 on esitetty esimerkit elinaikaeroitteisella fluoresenssimikroskoopilla otetuista kuvista säilytyksen eri vaiheissa. Kuvat on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla näytteen pinnalta. Kuvasarja 8.14(a) on intensiteettimoduloitu ja sarjassa 8.14(b) samat kuvat on esitetty ilman intensiteettimodulointia. Intensiteettimoduloidusta kuvasarjasta nähdään näytteen pinnan muuttuvan nopeasti kiteytymisen alkuvaiheessa. Näytteiden elinaika muuttuu selvästi pidemmäksi seurannan aikana, mikä nähdään erityisesti alemmasta kuvasarjasta.



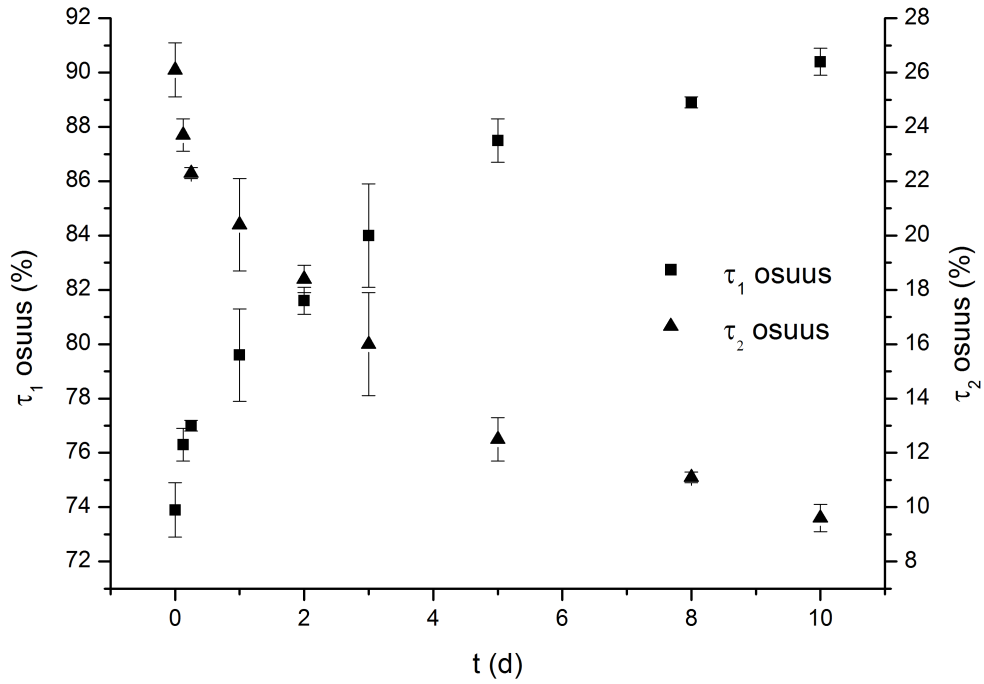
Kuva 8.14 FLM-kuvat lämpökaapissa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa $0\text{ }\%$ RH:ssä säilytetyistä näytteistä säilytyksen eri vaiheissa. Kuvasarja (a) on intensiteettimoduloitu. Kuvasarjassa (b) samat FLM-kuvat on esitetty ilman intensiteettimodulointia. Kaikki kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405\text{ nm}$ ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900\text{ nm}$. Kuvien koko on $80\times 80\text{ }\mu\text{m}$ ja resoluutio $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

FLM-kuvista laskettiin fluoresenssin elinajat τ_1 ja τ_2 , niiden suhteelliset osuudet ja keskimääräinen elinaika τ_{av} koko kuvan alueelta. Vuorokauden säilytyksen jälkeen eli pinnan alettua selvästi kiteytyä, sovitusten virheet olivat odotetusti isompia kuin

puhtaiden kiinteiden muotojen elinaikasovitusten virheet. Suurimmillaan $\chi^2 = 3,1$ viiden ja kahdeksan vuorokauden säilytyksen jälkeen. Elinaikasovitus tehtiin pääasiassa kolmeen rinnakkaisesta näytteestä otettuun FLM-kuvaan. Poikkeuksena tästä tuoreiden näytteiden ($t = 0$) elinaika laskettiin kahdesta rinnakkaisen näytteen FLM-kuvasta. FLM-kuvat, joille elinaikasovitus tehtiin, on esitetty liitteessä 1. Elinajat virherajoiheen on esitetty säilytysajan funktiona kuvassa 8.15 ja elinaikojen suhteelliset osuudet virherajoiheen on esitetty vastaavasti kuvassa 8.16. Elinajat ja niiden suhteelliset osuudet virherajoiheen säilytyksen aikana on esitetty myös taulukossa 8.6.



Kuva 8.15 Lämpökaapissa 60°C lämpötilassa 0% RH:ssa säilytettyjen näytteiden fluoresenssin elinajat τ_1 ja τ_2 sekä keskimääräinen elinaika τ_{av} virherajoiheen ajan funktiona. Tulokset on laskettu kolmesta rinnakkaisesta FLM-kuvasta lukuun ottamatta tuoreiden näytteiden ($t = 0$) arvoja, jotka on laskettu kahdesta rinnakkaisesta kuvasta.

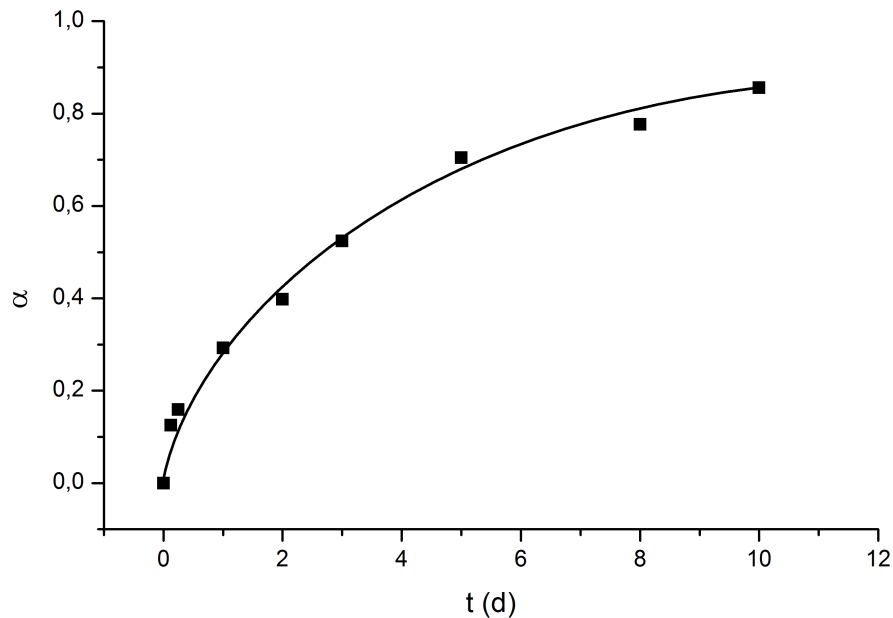


Kuva 8.16 Lämpökaapissa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa $0\text{ }\%$ RH:ssa säilytettyjen näytteiden fluoresenssin elinaikojen τ_1 ja τ_2 suhteelliset osuudet virherajoineen ajan funktiona. Tulokset on laskettu kolmesta rinnakkaisesta FLM-kuvasta lukuun ottamatta tuoreiden näytteiden ($t = 0$) arvoja, jotka on laskettu kahdesta rinnakkaisesta kuvasta.

Taulukko 8.6 Lämpökaapissa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa $0\text{ }\%$ RH:ssa säilytettyjen amorfisten näytteiden fluoresenssin elinajat τ_1 ja τ_2 , niiden suhteelliset osuudet sekä keskimääräinen elin aika τ_{av} virherajoineen säilytyksen eri vaiheissa. Tulokset on laskettu kolmesta rinnakkaisesta FLM-kuvasta lukuun ottamatta tuoreiden näytteiden ($t = 0$) arvoja, jotka on laskettu kahdesta rinnakkaisesta kuvasta.

aika (d)	τ_1 (ns)	osuus (%)	τ_2 (ns)	osuus (%)	τ_{av} (ns)
0	$1,03 \pm 0,02$	$73,9 \pm 1,0$	$2,57 \pm 0,04$	$26,1 \pm 1,0$	$1,75 \pm 0,01$
0,125	$1,05 \pm 0,01$	$76,3 \pm 0,6$	$2,66 \pm 0,03$	$23,7 \pm 0,6$	$1,76 \pm 0,01$
0,25	$1,07 \pm 0,01$	$77,0 \pm 0,2$	$2,68 \pm 0,02$	$22,3 \pm 0,2$	$1,76 \pm 0,01$
1	$1,12 \pm 0,03$	$79,6 \pm 1,7$	$2,90 \pm 0,12$	$20,4 \pm 1,7$	$1,86 \pm 0,03$
2	$1,17 \pm 0,01$	$81,6 \pm 0,5$	$3,07 \pm 0,01$	$18,4 \pm 0,5$	$1,87 \pm 0,02$
3	$1,23 \pm 0,01$	$84,0 \pm 1,9$	$3,38 \pm 0,16$	$16,0 \pm 1,9$	$1,96 \pm 0,01$
5	$1,30 \pm 0,03$	$87,5 \pm 0,8$	$3,99 \pm 0,23$	$12,5 \pm 0,8$	$2,11 \pm 0,07$
8	$1,38 \pm 0,05$	$88,9 \pm 0,2$	$4,52 \pm 0,36$	$11,1 \pm 0,2$	$2,29 \pm 0,16$
10	$1,48 \pm 0,05$	$90,4 \pm 0,5$	$5,41 \pm 0,11$	$9,6 \pm 0,5$	$2,58 \pm 0,10$

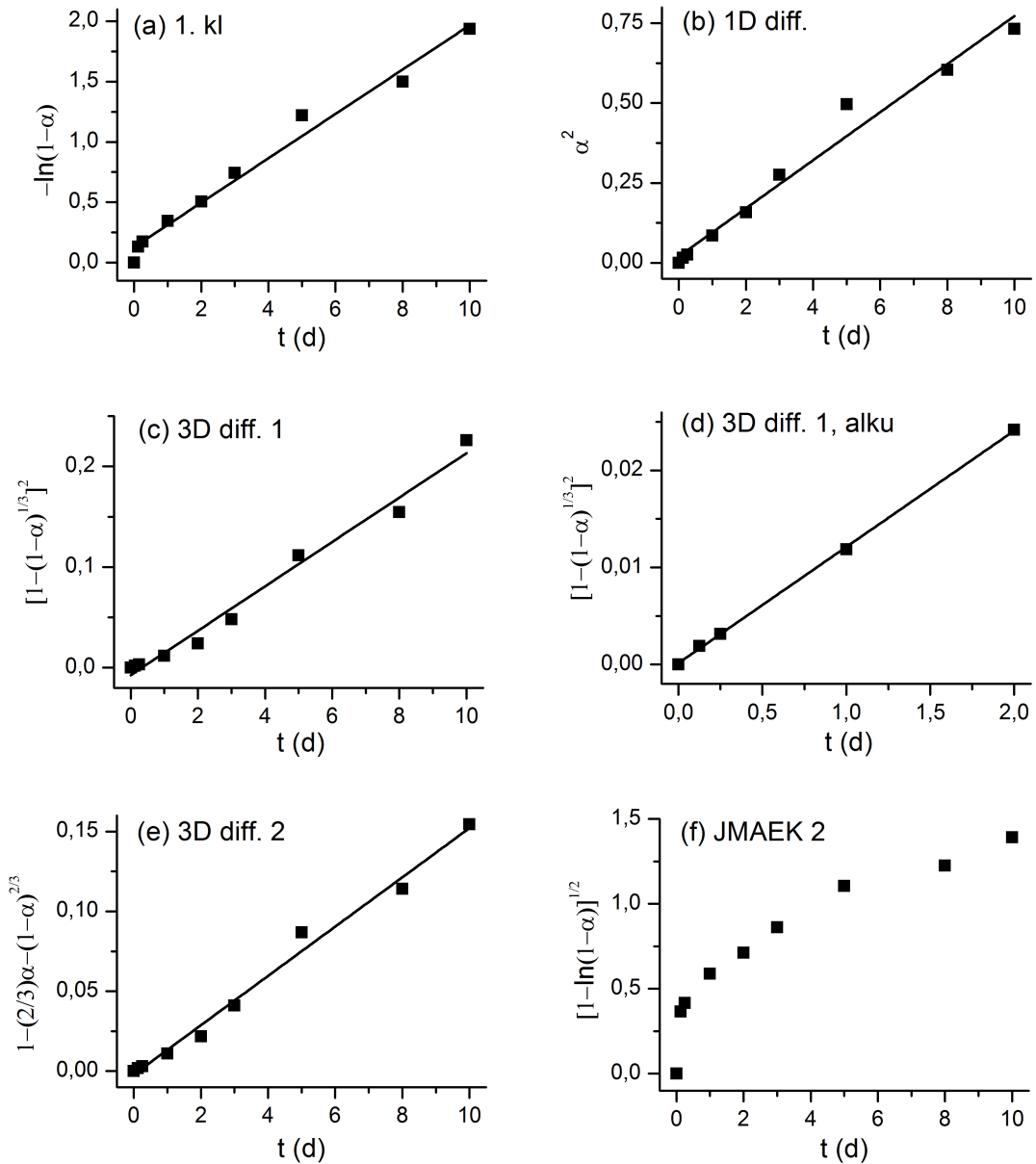
Kiteytymisen alussa elinajat ja niiden osuudet vastasivat amorfiselle indometasiinille määritettyjä arvoja. Reaktion edetessä elinajat osuukseineen lähestyivät γ -kiteiselle indometasiinille määritettyjä arvoja (taulukko 8.2). Elinajat kasvoivat lähes lineaarisesti reaktion edetessä, mutta elinaikojen suhteelliset osuudet muuttuivat kiteytymisen alkuvaiheessa nopeasti ja myöhemmin hitaammin. Suhteellinen osuus ajan funktiona muistutti reaktion edetessä hidastuvan reaktion konversioastetta, joten osuutta ajan funktiona tarkasteltiin reaktiokinetiikan näkökulmasta. Konversioaste laskettiin elinajan τ_2 suhteellisesta osuudesta yhtälön 4.5 mukaan. Kiteytymisen alussa ($t = 0$) osuus oli 26,1 %. Kiteytymisen päättyessä ($t = \infty$) kaiken amorfisen indometasiinin oletettiin kiteytyneen γ -muotoon, joten elinajan τ_2 suhteellisenä osuutena käytettiin puhtaalle γ -indometasiinille määritettyä arvoa (taulukko 8.2). Konversioaste on esitetty kuvassa 8.17 ajan funktiona.



Kuva 8.17 Lämpökaapissa 60°C lämpötilassa 0 % RH:ssa säilytettyjen näytteiden elinajan τ_2 suhteellisesta osuudesta määritetty konversioaste α ajan t funktiona.

Konversioaste sijoitettiin neljään konversioasteen muotoa vastaavaan reaktiomalliin. Reaktiomalleina käytettiin ensimmäisen kertaluvun kiteytymistä (1. kl, yhtälö 4.8), yksiulotteista diffuusiorajoitettua kiteytymistä (1D diff., yhtälö 4.21), yksiulotteisesta diffuusiorajoitetusta kiteytymisestä johdettua yksinkertaista kolmiulotteisen kiteytymisen mallia (3D diff. 1, yhtälö 4.41) ja kutistuva ydin -mallia (3D diff. 2, yhtälö 4.39). Konversioaste sijoitettiin myös JMAEK-yhtälöön (JMAEK 2, yhtälö 4.15), jolla indometasiinin kiteytymistä tyypillisesti kuvataan, vaikka konversioasteen muutos ei olekaan sigmoidaalinen. JMAEK-yhtälöstä käytettiin muotoa, jossa

$n = 2$. Konversioasteesta määritetyt kiteytymismallien mukaiset kuvaajat ja niihin tehdyt lineaariset sovitukset on esitetty kuvassa 8.18. Koska 3D diff. 1 -malli kuvaa kolmiulotteista kiteytymistä hyvin vain pienillä konversioasteilla, kuvassa on esitetty 3D diff. 1 -malliin sovitettu konversioaste koko säilytyksen ajan lisäksi myös ensimmäisen kahden vuorokauden ajalta. Kuvan 8.18 sovitesuorien kulmakertoimet k (s^{-1}) ja vakio termit virherajoihin on koottu taulukkoon 8.7.



Kuva 8.18 Konversioasteesta määritetyt eri kiteytymismallien integraalimuotoiset kuvaajat: (a) 1. kertaluvun reaktio, (b) yksiulotteinen diffuusiorajoitettu reaktio, (c) ja (d) yksinkertainen kolmiulotteinen diffuusiorajoitettu reaktio, (e) kutistuva ydin -malli sekä (f) JMAEK-yhtälö, jossa $n = 2$. Yksinkertaisen kolmiulotteisen diffuusiorajoitetun reaktiomallin mukainen kuvaaja on esitetty koko seurantajaksolta (c) ja ensimmäisen kahden vuorokauden ajalta (d).

Taulukko 8.7 Kiteytymismalleihin sovitettujen suorien kulmakertoimet k ja vakiotermi virherajoineen. Kiteytymismallit järjestyksessä ylhäältä alkaen: 1. kertaluvun reaktio, yksiulotteinen diffuusiorajoitettu reaktio, yksinkertainen kolmiulotteinen diffuusiorajoitettu reaktio koko seurantajaksolta ja kahden ensimmäisen vuorokauden ajalta sekä kutistuva ydin -malli.

malli	k (10^{-6} s^{-1})	vakiotermi
1. kl	$2,127 \pm 0,106$	$0,1290 \pm 0,0434$
1D diff.	$0,870 \pm 0,050$	$0,0204 \pm 0,0205$
3D diff. 1	$0,255 \pm 0,013$	$-0,0073 \pm 0,0051$
3D diff. 1, alku	$0,139 \pm 0,002$	$0,0001 \pm 0,0002$
3D diff. 2	$0,179 \pm 0,007$	$-0,0021 \pm 0,0029$

Laskennallisesti konversioastetta vastaavat parhaiten mallit 3D diff. 2 koko seurantajaksolta ja 3D diff. 1 kahden ensimmäisen vuorokauden ajalta. Suorien 8.18(e) ja 8.18(d) leikkauspisteet ovat lähimpänä nollaa ja kulmakertoimien virheet ovat pienimmät. Myös mallin 1D diff. pisteet asettuvat melko hyvin samalle suoralle. Kiteytyminen ei noudata ensimmäisen kertaluvun reaktiomallia reaktion alussa, kuten nähdään kuvasta 8.18(a), mutta tämän jälkeen pisteet ovat melko hyvin suoralla. Kuvassa 8.18(f) esitetty JMAEK 2 -malliin sijoitettu konversioaste ei muodosta suoraa, joten malli ei kuvaa kiteytymisen etenemistä tutkitulla aikaskaalalla. FLM:llä määritetty konversioaste kuvaa näytteen ohuen pintakerroksen kiteytymistä koko näytteen kiteytymisen sijaan, mikä voi osaltaan selittää, miksi tulokset poikkeavat aiempien tutkimusten tuloksista.

Näytteen kiteytymisessä havaittiin mikroskoopin läpi tarkasteltaessa kaksi eri vaihetta: näytteen pinnan peittyminen ohuella kiteisellä kerroksella ja kiteisen kerroksen läpimitan kasvaminen. Tutkimuksessa määritetty konversioaste kuvaa pääasiassa kerroksen läpimitan kasvamista. Näytteen pinnan peittyminen kiteisellä kerroksella tapahtui nopeasti ensimmäisen kahden vuorokauden aikana, eikä käytössä olleella laitteistolla voitu seurata ohuen kiteisen kerroksen leviämistä. On mahdollista, että näytteen pinnan peittyminen ja kiteisen kerroksen paksuuden kasvaminen noudattavat eri kiteytymismalleja. Näytteet eivät olleet seurannan lopussa vielä FLM:n mitaussyvyydeltä täysin kiteisiä, joten seuranta olisi voitu jatkaa vielä pidempään, jolloin kuvan 8.18 kuvaajat voisivat näyttää toisenlaisilta.

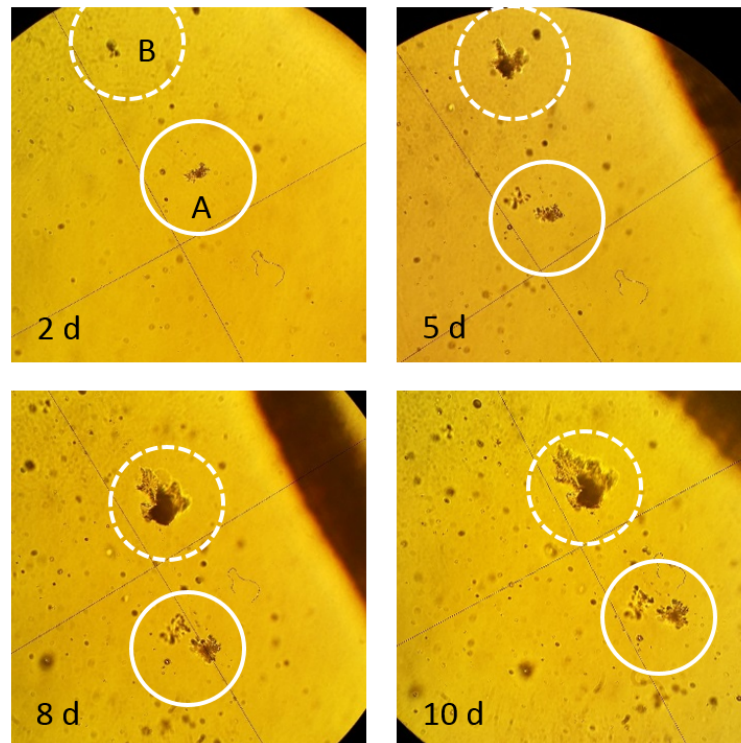
Tulosten perusteella koko seurannan ajan amorfisen indometasiinin kiteytyminen eteni diffuusiorajoitetusti pallomaisten hiukkasten pinnalta kohti ydintä. Tätä tulokintaa tukee sekä kuvan 8.18(e) kutistuva ydin -malli että kuvan 8.18(d) pienillä konversioasteilla kolmiulotteista diffuusiorajoitettua reaktiota kuvaava malli. Kyseisten rakenteiden olemassaolosta ei kuitenkaan ole aiempaa näyttöä. Myös yksiulotteisen

diffuusiorajoitetun reaktion malli (kuva 8.18(b)) voisi kuvata kiteytymisen etenemistä, vaikka pisteet eivät asetu yhtä hyvin suoralle kuin kuvissa 8.18(e) ja 8.18(d). Yksiulotteinen diffuusiorajoitettu kiteytyminen kuvaa hyvin käytännön havaintoa kiteytymisen etenemisestä: amorfisen pisaran pinta voidaan ajatella äärettömäksi tasoksi, jonka pinnalla oleva kiteinen kerros kasvaa hidastuvasti. Diffuusiorajoitettujen mallien vaatima kiteisen kerroksen läpi diffundoituva ja kiteytymistä aiheuttava aine on todennäköisesti vesi, joka lisää molekyylien liikkuvuutta ja siten edesauttaa kiteytymistä.

Ensimmäisen säilytysvuorokauden jälkeen näytteiden pinnalle levinnyt kiteinen kerros on niin ohut, ettei amorfisen ja kiteisen indometasiinin rajapinta erotu elinaikojen muutoksena FLM-kuvissa. FLM-kuvissa erottuu ensimmäisestä vuorokaudesta alkaen intensiteetiltään erilaisia alueita. Intensiteetin perusteella ei silti voi suoraan päätellä, onko alue kiteytynyt vai onko alueella vain kolmiulotteinen rakenne, jossa kohdentamistaso näkyy kirkkaimpana. Ensimmäisen vuorokauden aikana elinaikojen suhteelliset osuudet kuitenkin muuttuvat, mikä nähdään kuvasta 8.16. Jos käytössä olisi laitteisto, jossa säilytysolosuhteet voitaisiin luoda mikroskooppiin kiinnitetyn laitteen ympärille ja näytteitä voidaan kuvata helposti esimerkiksi tunnin välein, voitaisiin mahdollisesti havaita myös pinnan peittymiseen liittyvä elinaikojen muutos. Suhteellisten osuuksien ero (alle 6 %) on kuitenkin luultavasti liian pieni, että sen sisällä tapahtuvia muutoksia saataisiin luotettavasti mitattua.

8.3.2 Kiteytyminen 100 % suhteellisessa ilmankosteudessa

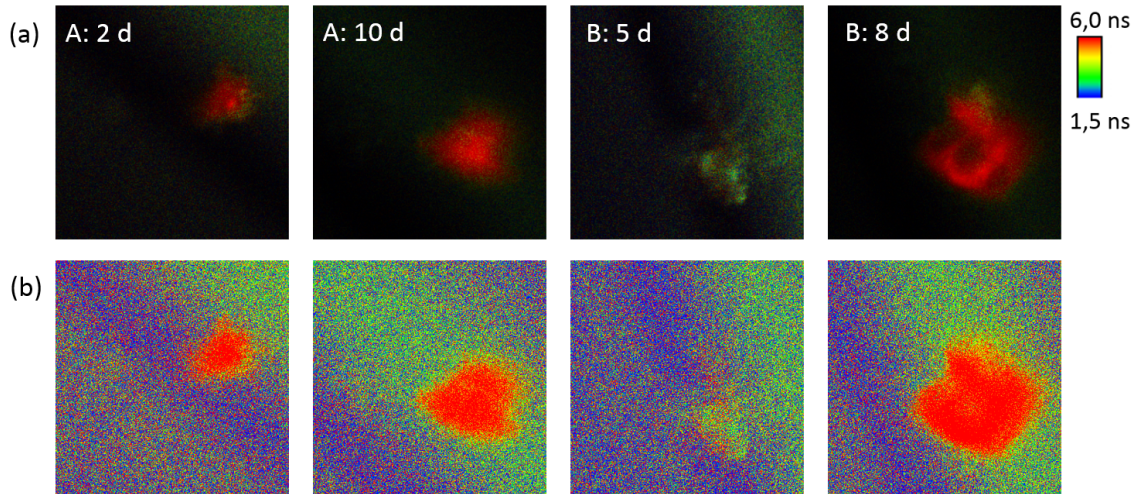
Huoneenlämmössä 100 % RH:ssa säilytetyt näytteet kuvattiin 2, 5, 8 ja 10 vuorokauden säilytyksen jälkeen. Näytteet kiteytyivät selvästi eri tavalla kuin lämpökäypissä säilytetyt näytteet. Kymmenen vuorokauden kuluttua näytteet muistuttivat vielä tuoretta amorfista indometasiinia, mutta valomikroskoopin läpi tarkastellessa näytteissä erottui lukuisia pieniä kiteytyneitä alueita. Kuvassa 8.19 on esitetty valomikroskooppikuvat samasta seurantanäytteestä jokaiselta mittauspäivältä. Kuvat on otettu samasta kohdasta näytettä, ja kuviin on ympyröity alueet *A* ja *B*, joiden sisällä tapahtunutta kiteytymistä seurattiin elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla. Kuvasta 8.19 nähdään, että *A*:n kiteytynyt alue kasvaa vähitellen reunoilta säilytyksen edetessä. Alueen *B* sisällä oleva kiteytynyt kohta kasvaa huomattavasti nopeammin: kahden vuorokauden säilytyksen jälkeen kohta erottuu pieninä epätasaisuutena amorfisessa pinnassa, mutta seuraavaan kuvauskertaan mennessä alueelle on muodostunut selkeästi kiteytynyt alue. Kahdeksan vuorokauden säilytyksen jälkeen *B*:n kiteytynyt alue on kasvanut selvästi suuremmaksi.



Kuva 8.19 Valomikroskooppikuvat 100 % RH:ssa säilytetyn amorfisen näytteen samasta kohdasta 2, 5, 8 ja 10 vuorokauden säilytyksen jälkeen. Kuvissa on ympyröity alueet A (katkoviiva) ja B (yhtenäinen viiva), joiden kiteytymistä seurattiin FLM-mittauksilla. Kuvat on otettu 40-kertaisesta suurentavalla ilmaobjektiivilla.

Kuvassa 8.20 on esitetty FLM-kuvat alueesta A kahden ja kymmenen vuorokauden säilytyksen jälkeen ja alueesta B viiden ja kahdeksan vuorokauden säilytyksen jälkeen. Kuvassa 8.20 kiteytyneen ja amorfisen alueen rajat ovat huomattavasti selkeämmät kuin lämpökaapissa säilytetyillä näytteillä, ja kiteytyneiden alueiden fluoresenssin intensiteetti on selvästi suurempi kuin amorfisen ympäristön. FLM-kuvien perusteella alueen A sisällä oleva kiteytynyt alue kasvaa säilytyksen aikana. Alueen B sisällä oleva kiteinen alue ei erotu FLM-kuvassa selvästi kiteisenä vielä viiden päivän säilytyksen jälkeen. Fluoresenssin intensiteetti ei ole kuitenkaan alueella enää tasainen ja FLM-kuvassa on hieman kiteiseen indometasiiniin viittaavaa punaista väriä. Kahdeksan vuorokauden säilytyksen jälkeen alue on selvästi kiteinen ja kasvanut merkittävästi suuremmaksi. Molemmissa tapauksissa ainoastaan valomikroskooppikuvissa tummana erottuva tiivis kiteinen alue on FLM-kuvien perusteella kiteytynyt.

Kiteisten alueiden kaksieksponentiaalisella elinaikasovituksella määritetyt elinajat ja niiden suhteelliset osuudet on esitetty taulukossa 8.8. Kiteisen alueen ympärillä $\tau_1 = 0,90\text{--}0,99$ ns (74,8–78,1 %) ja $\tau_2 = 2,42\text{--}2,61$ ns (21,9–25,2 %), jotka vastaavat amorfisen indometasiinin arvoja. Elinajojen perusteella näytteiden kiteiset



Kuva 8.20 Intensiiteettimoduloidut FLM-kuvat (a) ja FLM-kuvat ilman intensiteettiä (b) alueesta A 2 ja 10 vuorokauden säilytyksen jälkeen sekä alueesta B 5 ja 8 vuorokauden säilytyksen jälkeen. Kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900 \text{ nm}$. Kuvien koko on $80 \times 80 \mu\text{m}$ ja resoluutio $0,2 \mu\text{m}$.

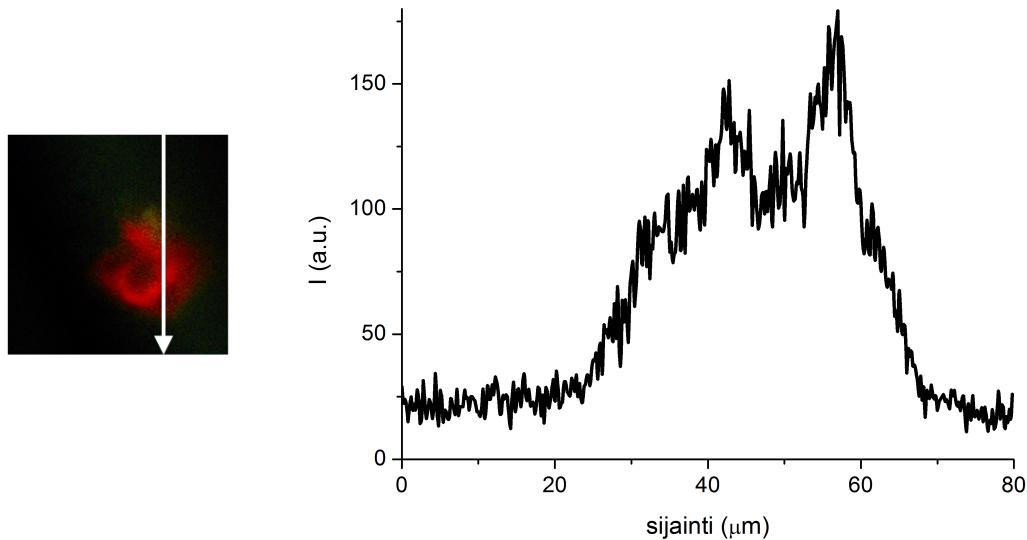
alueet ovat kiteytyneet γ -muotoon. Viiden vuorokauden säilytyksen jälkeen alueella B olevan epätasaisuuden elinajat vastaavat vielä amorfista indometasiinia. Valomikroskooppikuvassa kiteytynyt alue erottuu kuitenkin selvästi jo viiden vuorokauden jälkeen. Muutos näyttäisi tapahtuneen riittävän syvällä näytteen pinnan alapuolella, ettei kiteinen alue erotu vielä FLM-kuvassa. Kiteytynyt alue on kasvanut seuraavaan mittauskertaan mennessä, jolloin alue on myös lähempänä pintaa ja erottuu selvästi amorfisesta taustasta.

Taulukko 8.8 Huoneenlämmössä 100 % RH:ssa säilytettyjen näytteiden kiteytyneiden alueiden A ja B elinajat τ_1 ja τ_2 sekä niiden suhteelliset osuudet. FLM-kuvat alueista on esitetty kuvassa 8.20.

alue	τ_1 (ns)	osuus (%)	τ_2 (ns)	osuus (%)
A: 2 d	1,61	87,6	3,12	12,4
A: 10 d	1,65	94,6	3,83	5,4
B: 5 d	0,85	71,4	2,29	28,6
B: 8 d	1,63	92,6	3,68	7,4

Huoneenlämmössä 100 % RH:ssa säilytettyjen näytteiden FLM-kuvissa amorfisen indometasiinin fluoresenssin intensiteetti on selvästi heikompi kuin γ -indometasiinin, mikä vastaa aiempia tuloksia [6]. Intensiiteettieron havainnollistamiseksi kuvassa 8.21 on esitetty intensiteettiprofilili kahdeksan vuorokautta vanhasta näytteestä alueen B-kohdalta. Kiteisen alueen kohdalla intensiteetti kasvaa jyrkästi nelinkertaiseksi, ja

korkeimmillaan se on noin seitsemänkertainen amorfisen indometasiinin fluoresenssin intensiteettiin verrattuna. Kiteisen alueen halkaisijaksi voidaan arvioida kuvasta noin $45\ \mu\text{m}$.



Kuva 8.21 Fluoresenssin intensiteettiprofili 8 vuorokautta 100 % RH:ssa huoneenlämmössä säilytetystä näytteestä. Profili on piirretty nuolella vasemmanpuoleiseen kuvaan merkityltä alueelta. Kuva on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405\ \text{nm}$ ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900\ \text{nm}$. Kuvan koko on $80 \times 80\ \mu\text{m}$ ja resoluutio $0,2\ \mu\text{m}$.

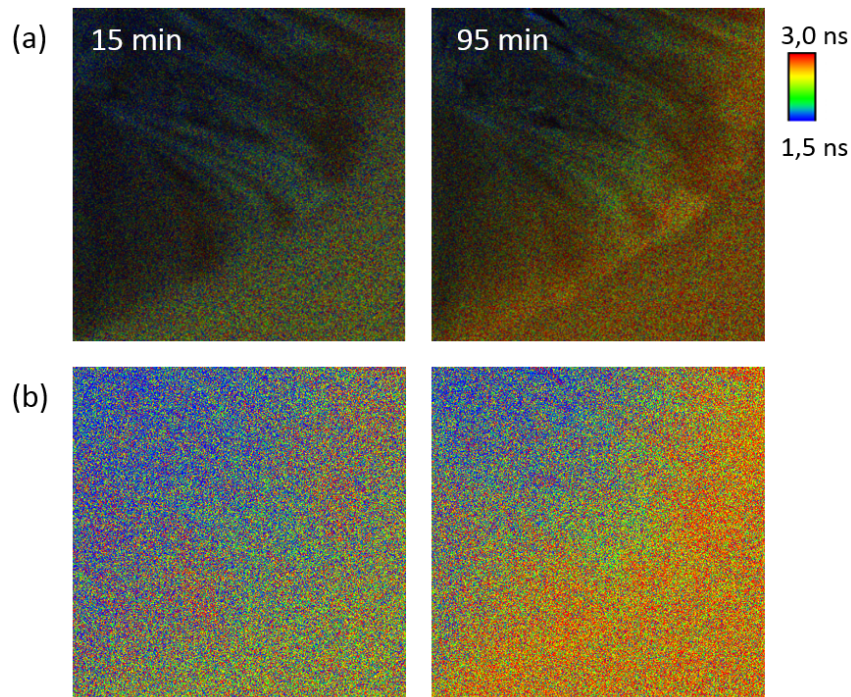
Indometasiini näyttäisi kiteytyneen tiiviiksi ja verrattain paksuksi alueeksi näytteen pinnalle, jolloin amorfisen indometasiinin fluoresenssisignaali ei merkittävästi sekoitu kiteisen indometasiinin fluoresenssiin. Kiteytyneen alueen fluoresenssin intensiteetti oli huomattavasti korkeampi kuin jauhemaista γ -indometasiinia kuvattaessa (luku 8.1.2). Kuvan 8.20 kiteisten alueiden vaimenemiskuvaaajiin voitiin tehdä myös yksiekspontiaalinen sovitus ($\chi^2 = 1,2\text{--}1,9$), jolloin elinajaksi saatiin $1,83\text{--}1,85\ \text{ns}$. Elin aika on luultavasti lähempänä γ -indometasiinin todellista elinaikaa kuin kaksiekspontiaalisella sovituksella määritetyt elinajat.

Koko kuvan alueelta laskettujen vaimenemiskuvaaajien perusteella ei voitu tehdä lukua 8.3.1 vastaavaa kineettistä tarkastelua. Näytteiden pinta ei peittynyt seurannan aikana kiteisellä kerroksella kuten lämpökaapissa säilytetyt näytteet kiteytyivät, vaan näytteet kiteytyivät pieniltä, toisistaan verrattain kaukana olevilta alueilta. Koska kiteytyminen tapahtui vain pienellä alueella, koko kuvan alueelta määritetyt elinajat vastasivat vielä 10 vuorokauden jälkeenkin amorfista indometasiinia. Tutkimuksessa käytetyllä elin aikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla kuvattava alue on muutoksiin nähden pieni erityisesti, jos kiteisten alueiden varsinaista kasvua ei

nähdä vaan kiteytyminen havaitaan FLM-kuvissa vasta myöhäisessä vaiheessa, kuten havaittiin alueella *B*. Jotta FLM-kuvissa havaittu kiteytyminen edustaisi koko näytteen kiteytymistä, kuvia pitäisi ottaa huomattavasti enemmän näytteen eri kohdista.

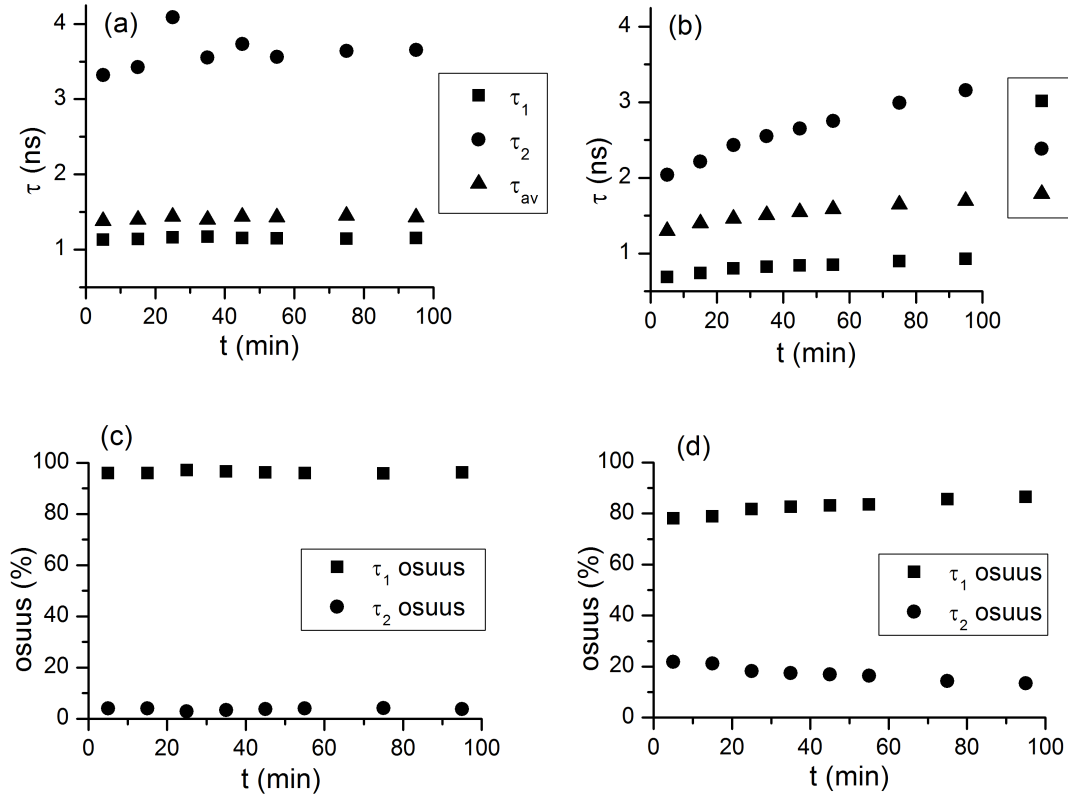
8.3.3 Etanolilla aiheutettu kiteytyminen

Amorfisen indometasiinin etanolilla aiheutettua kiteytymistä seurattiin 100-kertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla. Mikroskooppilasin päälle laitettiin pisara etanolia, jonka päälle lisättiin amorfisen indometasiinin sirpale. Kiteytyminen aiheutettiin siten amorfisen sirpaleen lasia vasten olevalla pinnalla. Etanolipisara levisi millimetrien kokoiselle alueelle ja liuotti osan indometasiinikappaleesta. FLM-seurantaan valittiin alue, jossa kiteytymisen huomattiin alkaneen. Ensimmäinen FLM-kuva otettiin 5 minuutin kuluttua amorfisen sirpaleen lisäämisestä etanolipisaran päälle, minkä jälkeen näytettä kuvattiin aluksi 10 minuutin ja myöhemmin 20 minuutin välein. Kaikki seurannan aikana otetut FLM-kuvat on esitetty liitteessä 2. Kuvassa 8.22 on esitetty FLM-kuvat 15 min ja 95 min sirpaleen lisäämisen jälkeen.



Kuva 8.22 Intensiteettimoduloidut FLM-kuvat (a) ja ilman intensiteettiä esitetyt FLM-kuvat (b) etanolilla aiheutetusta kiteytymisestä 15 ja 95 min kiteytymisen käynnistämisen jälkeen. Kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900 \text{ nm}$. Kuvien koko on $50 \times 50 \text{ }\mu\text{m}$ ja resoluutio $0,1 \text{ }\mu\text{m}$.

Kuvissa erottuu selvästi lyhyemmän elinajan alue vasemmassa yläkulmassa ja pidemmän elinajan alue oikeassa alakulmassa. Erityisesti oikea alakulma näyttäisi muuttuvan seurannan aikana. Kuvassa 8.23 on esitetty keskimääräinen fluoresenssin elinaika τ_{av} , elinajat τ_1 ja τ_2 sekä niiden suhteelliset osuudet vasemmassa yläkulmassa ja oikeassa alakulmassa ajan funktiona.

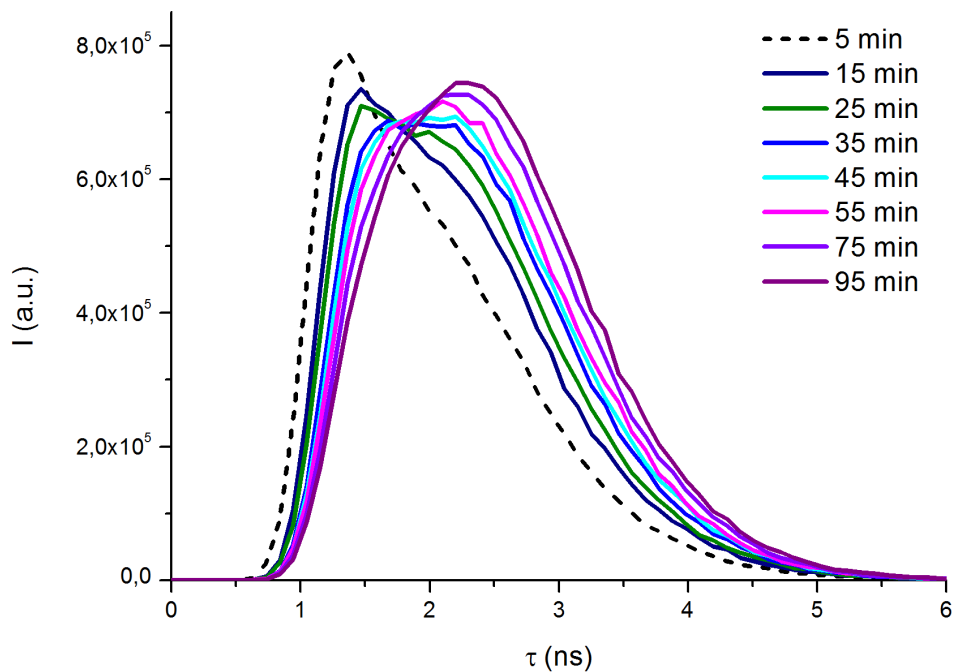


Kuva 8.23 Fluoresenssin elinajat τ_1 ja τ_2 , keskimääräinen elinaika τ_{av} ja elinaikojen suhteelliset osuudet etanolilla aiheutetun kiteytymisen aikana ajan funktiona. Kuvassa (a) on esitetty elinajat FLM-kuvien vasemmassa yläkulmassa ja kuvassa (b) elinajat FLM-kuvien oikeassa alareunassa. Vastaavasti elinaikojen osuudet vasemmassa yläkulmassa on esitetty kuvassa (c) ja oikeassa alakulmassa kuvassa (d). Esimerkit FLM-kuvista on esitetty kuvassa 8.22.

FLM-kuvien vasemmassa yläkulmassa elinaika $\tau_1 \approx 1,15$ ns koko seurannan ajan. τ_2 vaihtelee hieman enemmän, mutta vaihtelu on melko satunnaista ja arvot samansuuntaisia. Myös elinaikojen osuudet (elinajan τ_1 osuus on n. 96 %) pysyvät lähes vakiona seurannan ajan. Vasemman yläkulman elinajat ja osuudet vastaavat α -kiteiselle indometasiinille määritettyjä arvoja (taulukko 8.2), eli amorfisen indometasiini näyttäisi kiteytyvän α -muotoon etanolin avulla. FLM-kuvien oikeassa alakulmassa sen sijaan indometasiinin elinajat ja elinaikojen suhteelliset osuudet muuttuvat selkeästi ja järjestelmällisesti seurannan aikana. Reaktion alussa elinajat ja niiden suhteelliset osuudet vastaavat selvästi amorfisen indometasiinin arvoja, ja

reaktion edetessä elinajat kasvavat kohti kiteisen indometasiinin arvoja. Vastaavasti myös elinajan τ_1 osuus kasvaa ja τ_2 :n osuus pienenee. Elinajojen perusteella vaikuttaa siltä, ettei reaktio ehtinyt edetä loppuun asti 95 minuutin seurannan aikana.

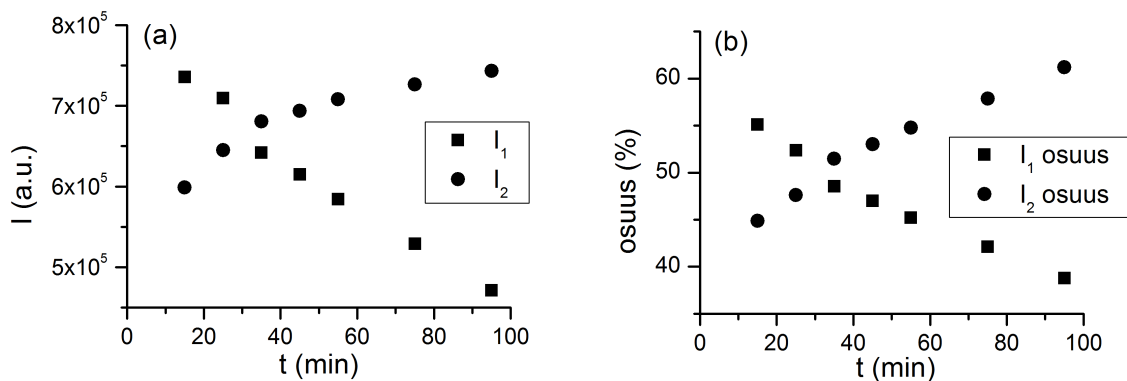
Koska FLM-kuvissa esiintyi selvästi useaa eri elinaikaa, koko kuvien alueelta määritettyjen fluoresenssien vaimenemiskuvauksiin tehtyjen kaksiekspotentiaalisten sovitusvirheet olivat suuria, $\chi^2 \approx 6, 7 - 10, 4$, eikä indometasiinin kiteytymisen kineetiikkaa voitu siksi analysoida niiden avulla. Sen sijaan kineetiikkaa voitiin tarkastella jossain määrin fluoresenssin elinaikajakauman muutoksen kautta: näytettä ei siirretty FLM-kuvien ottamisen välillä, joten FLM-kuvien intensiteetit ovat keskenään verrannollisia. Elinajajakaumat reaktioajan funktiona on esitetty kuvassa 8.24.



Kuva 8.24 Elinajajakaumat ajan funktiona etanolilla aiheutetun kiteytymisen aikana. Elinajajakaumat on määritetty FLM-kuvista, jotka on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900 \text{ nm}$ ja joiden koko on $50 \times 50 \text{ }\mu\text{m}$ ja resoluutio $0,1 \text{ }\mu\text{m}$. Jakaumat on määritetty koko kuvan alueelta.

Elinajajakaumat leikkaavat toisensa kohdassa $\tau \approx 1,8 \text{ ns}$ lukuun ottamatta ensimmäistä mittausta, joka on merkitty kuvaan 8.24 katkoviivalla. Ensimmäisen FLM-kuvan ottohetkellä näytteessä oli luultavasti vielä runsaasti etanolia, mikä saattaa selittää, miksi ensimmäinen elinaikajakauma eroaa muista jakaumista. Ensimmäinen FLM-mittaus jätettiin huomiotta kineettisessä tarkastelussa.

Elinaikajakaumien perusteella näytteessä on kahta erilaista komponenttia, joista ensimmäisen osuus vähenee ja toisen osuus kasvaa reaktion edetessä. Reaktion alussa elinaikajakauman intensiteettimaksimi oli $\tau_1 = 1,468$ ns. Reaktion edetessä elinajan τ_1 intensiteetti pieneni, mutta elinajan $\tau_2 = 2,209$ ns intensiteetti kasvoi. Kuvassa 8.25(a) on esitetty τ_1 :n intensiteetti I_1 ja τ_2 :n intensiteetti I_2 ajan funktiona, ja kuvassa 8.25(b) intensiteettien suhteelliset osuudet ajan funktiona. Intensiteettien suhteelliset osuudet laskettiin jakamalla kumpikin intensiteetti erikseen intensiteettien summalla $I_1 + I_2$.

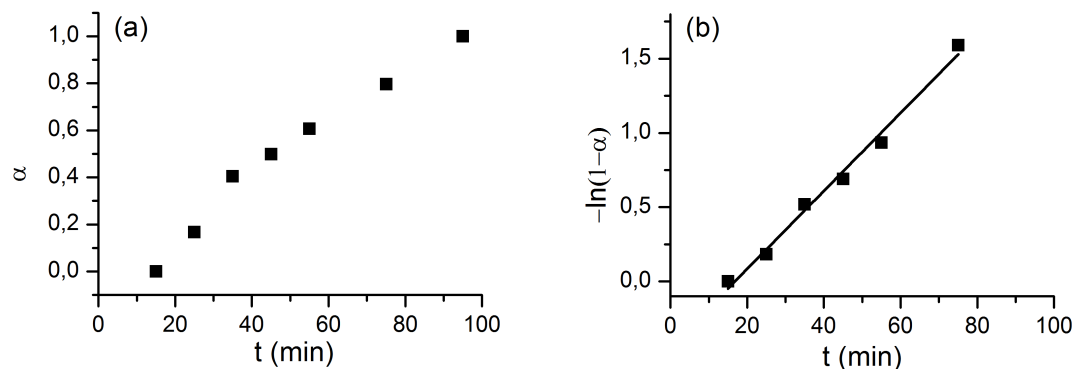


Kuva 8.25 Elinajan $\tau_1 = 1,468$ ns intensiteetti I_1 ja elinajan $\tau_2 = 2,209$ ns intensiteetti I_2 (a) sekä intensiteettien suhteelliset osuudet (b) ajan t funktiona etanolilla aiheutetun kiteytymisen aikana.

Intensiteettien arvoa reaktion alussa ja lopussa eikä reaktioon kuluvaa aikaa voitu määrittää mittaustuloksista, joten kineettinen tarkastelu on lähinnä suuntaa antava. Konversioaste laskettiin yhtälön 4.5 avulla olettaen, että $\alpha = 0$ hetkellä $t = 15$ min ja $\alpha = 1$ kun $t = 95$ min. Elinaikajakaumaan vaikutti todennäköisesti ainakin kaksi prosessia: amorfisen indometasiinin kiteytyminen ja etanolin haihtuminen. On mahdollista, että valtaosa etanolista on haihtunut ennen kineettisen tarkastelun aloittamista, mutta tätä on vaikea todeta tulosten perusteella. Kuvassa 8.26(a) on esitetty intensiteetin I_2 suhteellisesta osuudesta määritetty konversioaste. Konversioaste sijoitettiin ensimmäisen kertaluvun reaktiomalliin (yhtälö 4.8), jolloin saatu suora on esitetty kuvassa 8.26(b).

Reaktio näyttäisi noudattavan ensimmäisen kertaluvun reaktiomallia melko hyvin. Kuvan 8.26(b) sovitesuoran kulmakerroin on $k = (4,4 \pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Konversioaste sijoitettiin myös muihin tässä työssä käsiteltyihin reaktiomalleihin, mutta muut mallit kuvasivat reaktiota selkeästi huonommin.

Kineettisen tarkastelun luotettavuus olisi parempi, jos sekä kiteytymisen alku ($t = 0$) olisi saatu taltioitua ja kiteytymistä olisi seurattu pidempään – mielellään siihen asti, kunnes myös FLM-kuvien oikean alakulman elinajat olisivat vastanneet kiteistä



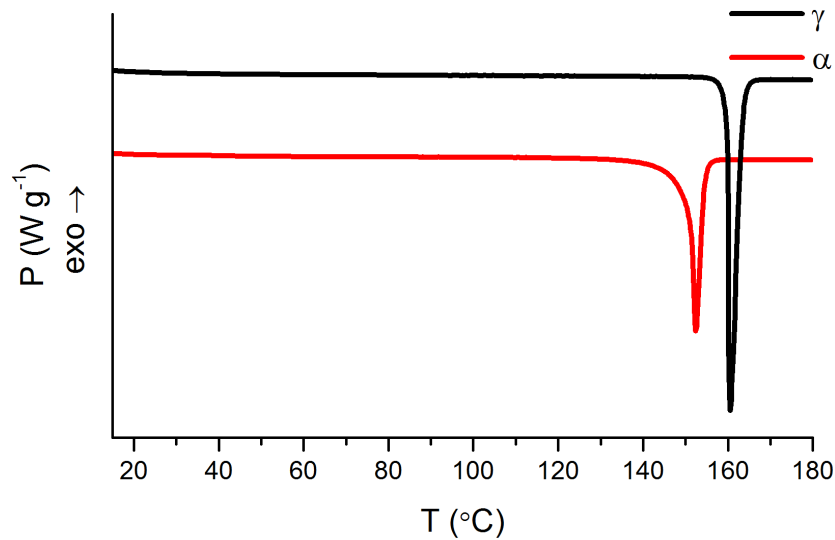
Kuva 8.26 Intensiteetin I_2 suhteellisesta osuudesta laskettu konversioaste α (a) ja ensimmäisen kertaluvun reaktiomallin mukainen kuvaaja (b) ajan t funktiona etanolilla aiheutetussa kiteytymisessä.

indometasiinia. Kiteytyminen kuitenkin näyttäisi hidastuneen jo 95 minuutin seurannan aikana, ja se olisi luultavasti hidastunut edelleen reaktion edetessä. Mittaus tulisi toistaa siten, että ensimmäinen FLM-kuva otetaan heti etanolin lisäämisen jälkeen ja seuranta jatketaan huomattavasti pidempään.

Koska myös elinaikojen suhteelliset osuudet muuttuvat kiteytymisen edetessä, kiinteinen tarkastelu on todennäköisesti mahdollista myös niiden avulla. Jotta elinaikasovitukset voidaan tehdä kuviin yhdenmukaisesti, FLM-kuvien tulee olla melko tasaisen värisiä eli niissä ei saisi olla useita eri elinaikoja. Elinaikasovituksen avulla voidaan arvioida FLM:llä seurattun alueen kiteytymisaste seurannan lopussa, vaikka näyte ei olisikaan täysin kiteytynyt, ja tätä samaa konversioastetta voidaan hyödyntää myös elinaikajakaumien avulla tehdyssä kiteytymistarkastelussa. Yhdistämällä kiteytymisen tarkastelu sekä elinaikajakaumien että elinaikojen osuuksien muutoksen avulla voidaan myös arvioida tarkastelujen luotettavuutta.

8.4 Indometasiinin termiset ominaisuudet

Indometasiinin termiset ominaisuudet määritettiin differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrialla. γ - ja α -kiteisen indometasiinin kunto tarkastettiin määrittämällä sulamisen onsets-lämpötila T_m sekä sulamisen entalpia ΔH_m . Kuvassa 8.27 on esitetty esimerkit γ - ja α -indometasiinin DSC-kuvaajista. Kuvaajat on jaettu näytteiden massoilla, joten piikkien pinta-alat ovat verrannollisia keskenään. Kummankin kidemuodon DSC-kuvaajissa esiintyi vain yksi, kide muodolle ominainen sulamispiikki. Taulukossa 8.9 on esitetty kiteiselle indometasiinille määritetyt arvot virherajoiineen. Kiteiselle indometasiinille määritetyt arvot vastaavat kirjallisuudessa (taulukko 6.1) esitettyjä arvoja.



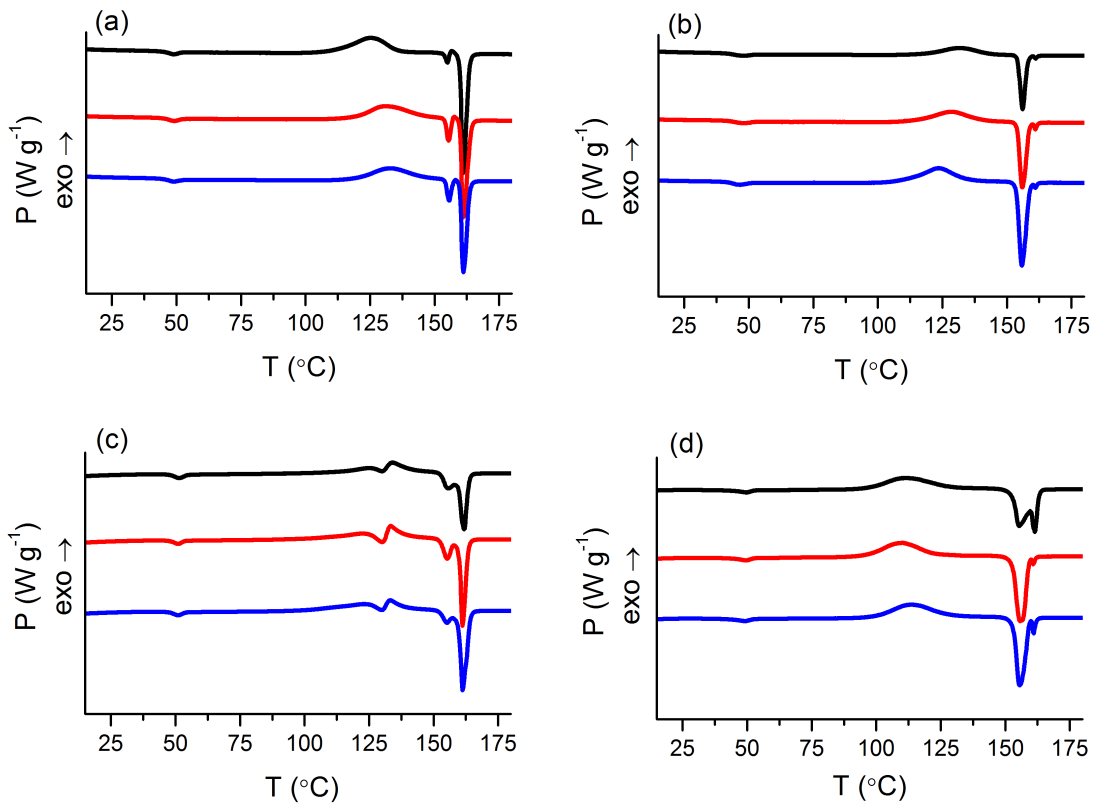
Kuva 8.27 Esimerkit γ - ja α -indometasiinin DSC-kuvaajista. Kuvaajat on määritetty lämmitysnopeudella $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Taulukko 8.9 Differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrialla määritetyt γ - ja α -indometasiinin sulamispisteet T_m ja sulamisentalpiat H_m . Tulokset on laskettu kahdesta rinnakkaisesta kuvaajasta.

näyte	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	H_m (J g^{-1})
γ	$159,75 \pm 0,02$	$-109,30 \pm 0,03$
α	$150,46 \pm 0,09$	-90 ± 3

Ainakin osittain amorfisia näytteitä oli neljä erilaista: tuore mikroskooppilasilla valmistettu, tuore alumiinipannulla valmistettu, kymmenen vuorokautta $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 0 % RH olosuhteissa säilytetty ja kymmenen vuorokautta $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 100 % RH olosuhteissa säilytetty amorfinen indometasiini. Näytteiden DSC-kuvaajat on esitetty kuvassa 8.28. Kaikkien amorfisten näytteiden DSC-kuvaajissa erottuu lasittumisalue noin $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa, eksoterminen kiteytymispiikki $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ yläpuolella sekä kaksi endoterministä sulamispiikkiä, jotka ovat $156\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $161\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa. Amorfinen indometasiini kiteytyy DSC-mittauksen aikana yleensä molempien kidemuotojen seokseksi. Alhaisempi sulamislämpötila viittaa α -muodon sulamiseen ja korkeampi γ -muodon sulamiseen.

Tuoreen amorfisen indometasiinin DSC-kuvaajat on esitetty kuvissa 8.28(a) ja 8.28(b). Ensimmäisen kuvan amorfiset näytteet valmistettiin sulattamalla indometasiinia mikroskooppilasilla. Jälkimmäisen kuvan näytteet valmistettiin vastaavasti, mutta sulatusastiana käytettiin alumiinipannua. Sekä kuvan 8.28(a) että 8.28(b) näytteet on mitattu muutaman tunnin sisällä amorfisen indometasiinin valmistamisesta, eivätkä ne ole ehtineet kiteytyä. Kuvan 8.28(a) DSC-kuvaajissa ensimmäisen sulamispäiikin pinta-ala ja siten sulamisentalpia on huomattavasti pienempi kuin toisen sulamispäiikin, eli mikroskooppilasilla valmistettu amorfinen indometasiini on kiteytynyt lämmityksen aikana pääasiassa γ -muotoon. Sen sijaan alumiinipannulla valmistetut näytteet kiteytyivät lämmityksen aikana pääasiassa α -muotoon. Kuvien 8.28(a) ja 8.28(b) perusteella indometasiini voi kiteytyä DSC-mittauksen aikana kumpaankin tahansa kidemuotoon, joten osittain kiteytyneiden amorfisten näytteiden sulamispäikkien pinta-aloista ei voi suoraan päätellä, mihin kidemuotoon näyte on kiteytynyt säilytyksen aikana. Alumiinipannulla valmistettujen näytteiden DSC-tulosten tarkempi analyysi sivuutetaan, koska muut seurantanäytteet on valmistettu sulattamalla indometasiinia mikroskooppilasilla.



Kuva 8.28 Amorfisten ja osittain amorfisten näytteiden DSC-kuvaajat. Tuore, mikroskooppilasille valmistettu amorfinen indometasiini (a); tuore, alumiinipannulla valmistettu amorfinen indometasiini (b); 10 d lämpökaapissa säilytetyt näytteet (c) ja 10 d 100 % RH:ssa säilytetyt näytteet (d). Kuvaajat on määritetty lämmitysnopeudella $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Seurantänäytteiden DSC-kuvaajat on esitetty kuvissa 8.28(c) ja 8.28(d). Lämpökaapissa säilytettyjen näytteiden (kuva 8.28(c)) kiteytyminen nähdään DSC-kuvaajissa kahtena eksotermisenä piikkinä. Kuvassa 8.28(d) esitetyt 100 % RH:ssa huoneenlämmössä säilytetyn amorfisen indometasiinin DSC-kuvaajat muistuttavat tuoreelle amorfiselle indometasiinille mitattuja kuvaajia, mutta indometasiini on kiteytynyt pääasiassa α -muotoon.

Amorfisille ja osittain amorfisille näytteille määritettiin lasittumislämpötila T_g , lasittumisalueen lämpökapasiteetin muutos ΔC_p , kiteytymisen onsets-arvo T_c sekä kiteytymisen entalpia ΔH_c . Lasittumisalueen entalpiarelaksaation takia lasittumislämpötilan onsets-arvoa ei voitu määrittää kaikille näytteille, joten T_g määritettiin lasittumisen midpoint-arvosta. Tulokset virherajoineen on koottu taulukkoon 8.10.

Taulukko 8.10 Amorfisilla ja osittain amorfisille näytteille määritetyt lasittumislämpötilat T_g , lämpökapasiteetin muutokset ΔC_p , kiteytymislämpötilat T_c ja kiteytymisentalpiat ΔH_c virherajoineen. Tulokset on laskettu kolmesta rinnakkaisesta kuvaajasta.

näyte	T_g (°C)	ΔC_p (J g ⁻¹ °C ⁻¹)	T_c (°C)	H_c (J g ⁻¹)
tuore	44,6 ± 0,6	0,39 ± 0,04	117 ± 5	66 ± 9
10 d lämpökaapissa	46,8 ± 0,7	0,18 ± 0,02	109 ± 6	45 ± 7
10 d 100 % RH	42 ± 2	0,12 ± 0,03	98 ± 2	72 ± 4

Näytteille määritetyt lasittumislämpötilat viittaavat hyvin säilytysolosuhteiden kosteuteen. 100 % RH eksikaattorissa säilytettyjen näytteiden lasittumislämpötila oli matalin, mikä voidaan selittää näytteiden absorboimalla kosteudella. Kuivassa eksikaattorissa säilytettyjen näytteiden lasittumislämpötila oli korkein. Tuoreita amorfisia näytteitä säilytettiin NaOH-eksikaattorissa tunnin ajan ennen DSC-näytteiden valmistusta, mikä ei luultavasti riittänyt poistamaan kaikkea näytteisiin valmistuksen aikana siirtynyttä kosteutta ja siksi lasittumislämpötila on matalampi kuin 10 vuorokautta eksikaattorissa säilytettyjen näytteiden lasittumislämpötila.

Tuore amorfinen indometasiini vastaa hyvin kirjallisuudessa esitettyjä arvoja (taulukko 6.2) muuten, mutta kiteytymisen entalpia on pienempi kuin vastaavalla menetelmällä valmistetulle amorfiselle indometasiinille on määritetty aiemmin. Kiteytymisen entalpia vastaa paremmin kylmäjauhamalla valmistetun amorfisen indometasiinin entalpiaa (taulukko 6.3).

Kiteytymisen etenemisen indikaattoreina voidaan käyttää lasittumisalueen lämpökapasiteetin muutosta, kiteytymislämpötilaa ja kiteytymisentalpiaa. Sekä ΔC_p että T_c ovat pienemmät kymmenen vuorokautta vanhoilla näytteillä kuin tuoreella amorfisella indometasiinilla, mikä viittaa näytteiden kiteytymiseen. Lämpökapasiteetin

muutoksen ja kiteytymislämpötilan perusteella 100 % RH:ssa säilytetty indometasiini on kiteytynyt enemmän kuin lämpökaapissa säilytetty. Kiteytymislämpötila on kuitenkin huono indikaattori indometasiinin kiteytymiselle (luku 4.2.2), eikä tulos vastaa näytteiden ulkonäköä. Seurantanäytteiden voidaan kuitenkin todeta poikkeavan tuoreista amorfisista näytteistä kiteytymislämpötilan ja lämpökapasiteetin muutoksen perusteella.

Kiteytymisentalpia vaihteli rinnakkaisnäytteiden välillä melko paljon. ΔH_c :n perusteella 100 % RH:ssa säilytetyt näytteet eivät ole kiteytyneet käytännössä lainkaan, vaan ovat lähempänä kirjallisuudessa esitettyä tuoreen amorfisen indometasiinin kiteytymisentalpiaa (taulukko 6.2) kuin tuoreelle amorfiselle määritetty kiteytymisentalpia. 100 % RH:ssa säilytetyt näytteet näyttivät lähes amorfisilta säilytyksen lopussa, joten näytteiden kiteisyysaste on luultavasti niin pieni, ettei se vaikuta kiteytymisen entalpiaan havaittavasti. Lämpökaapissa säilytettyjen näytteiden kiteytymisentalpia on sen sijaan selvästi pienempi kuin tuoreen amorfisen indometasiinin, mikä viittaa näytteiden kiteytyneen osittain säilytyksen aikana. Vaikka rinnakkaisten näytteiden kiteytymisentalpioiden välillä on melko paljon vaihtelua, kiteytymisentalpian perusteella arvioitu kiteytymisen edistyminen vastaa parhaiten näytteiden ulkonäköä.

9. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa selvitettiin, soveltuuko elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia amorfisen lääkeaineen kiteytymisen seuraamiseen. Mallilääkeaineena käytettiin indometasiinia, jonka tiedettiin fluoresoivan eri tavalla amorfisessa ja kiteisessä muodossa. Tulosten perusteella myös aikaerotteinen fluoresenssi eroaa indometasiinin muotojen välillä, joten näytteiden kiteytymistä voitiin seurata FLM:llä tietyissä tapauksissa.

Näytteiden käsittelyyn huomattiin liittyvän joitain rajoitteita. FLM:n virityslaserin havaittiin vahingoittavan näytteitä herkästi, joten näytteiden vahingoittumisen estämiseksi näytteitä ei saanut altistaa liian suurelle viritysintensiteetille edes hetkellisesti. Mikroskooppilasille asetettujen irtonaisten näytteiden kontakti mikroskooppilasiin oli huono ja siten mikroskooppilevyn läpi kuvattujen FLM-kuvien laatu heikko. Ongelma korjaantui, kun näytteet valmistettiin suoraan mikroskooppilasille ja kuvattiin näytteiden yläpinnalta. Varhaiset kiteytymisen asteet eivät erottuneet FLM-kuvissa, koska kiteisen aineen alapuolella olevan amorfisen muodon fluoresenssisignaali sekoittui kiteisen muodon fluoresenssiin. Fluorenssisignaalien sekoittumista voitiin kuitenkin hyödyntää myös kiteytymisen etenemisen tarkastelussa.

Kiteytymisen etenemistä voitiin arvioida fluoresenssin elinaikojen osuuden muutoksesta kiteytymisen edetessä, ja jos näytettä ei siirretty mittaushetkien välissä, myös elinaikajakauman muutoksesta. Amorfisen indometasiinia kiteytymistä seurattiin kymmenen vuorokauden ajan kaksissa eri säilytysolosuhteissa, lämpökaapissa 60 °C lämpötilassa 0 % RH:ssa ja huoneenlämmössä 100 % RH:ssa. Pidempien seurantatutkimusten lisäksi yksi amorfinen näyte kiteytettiin nopeasti etanolin avulla, jolloin kiteytymistä voitiin seurata näytettä siirtämättä.

Kiteytymisen mekanismit erosivat toisistaan eri seurantatutkimuksissa. Parhaimmat tulokset saatiin lämpökaapissa säilytetyistä näytteistä. Näytteiden pinta peittyi nopeasti ohuella kiteisellä kerroksella, joka kasvoi paksuutta seurannan edetessä. Sekä fluoresenssin elinajat että elinaikojen suhteelliset osuudet muuttuivat kiteytymisen edetessä, koska näytteiden pinnalle kiteytyneen alueen paksuuden kasvaessa kiteisen kerroksen alla olevan amorfisen aineen osuus havaitussa fluoresenssissa väheni.

Kiteytymisen kinetiikkaa tarkasteltiin elinaikojen suhteellisen osuuden muutoksesta, ja tulosten perusteella diffuusiorajoitetut reaktiomallit kuvasivat kiteytymisen etenemistä parhaiten.

100 % RH:ssa kiteytyneet alueet olivat tiiviitä ja selvästi paksumpia kuin lämpökaapissa kiteytyneet alueet, mutta ne olivat amorfisen indometasiinin ympäröimiä. Koska kuvissa erottui selkeästi useampia elinaikoja, näytteille ei voitu tehdä vastaavaa kineettistä tarkastelua kuin lämpökaapissa säilytetyille näytteille. FLM-kuvista voitiin tunnistaa kiteytyneet alueet sekä elinaikojen että fluoresenssin intensiteetin avulla, joten kiteytymisen etenemistä voitaisiin periaatteessa tarkastella kiteytyneen alueen pinta-alan avulla. Yksittäiset kiteytyneet alueet olivat kuitenkin kaukana toisistaan, ja jotta kiteytymistä voidaan tarkastella luotettavasti, näytteiden pinnasta pitäisi saada kuvattua edustava otos eli näytteiden pintaa pitäisi kuvata laajalta alueelta. Tutkimuksessa käytetyn elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin skannausala oli laajojen pintojen mielekkääseen kuvaamiseen liian pieni. Kiteytymisen seuraamiseen soveltuisi tässä tapauksessa paremmin FLM-laitteisto, jonka skannausala on suurempi kuin käytössä olleen laitteiston skannausala. Toisaalta, koska kiteytyneiden alueiden fluoresenssin intensiteetti oli selvästi amorfisten alueiden intensiteettiä suurempi, elinaikaerotteista tarkastelua ei välttämättä tarvita ja kiteytymisen seuraamisen pitäisi onnistua hyvin myös konfokaalimikroskoopilla.

Tutkimuksessa käytettiin differentiaalista pyyhkäisykalorimetriaa vain yhtä indometasiinin muotoa sisältäneiden näytteiden kunnan tarkistamiseen sekä seuranta-tutkimusten lopussa seurantanäytteiden kiteytymisen arvioimiseen. DSC-tulosten perusteella kymmenen vuorokautta vanhat seurantanäytteet poikkesivat tuoreista amorfisista näytteistä, joskin vain vähän. Seurantajakson aikana näytteet kiteytyivät lähinnä pinnalta, joten koko näytteen kiteytymisaste on todennäköisesti ollut seurannan lopussakin pieni, eikä DSC-tuloksissa havaittu siksi suuria eroja seurantanäytteiden välillä.

Kummassakin pitkän aikavälin seurannassa indometasiini kiteytyi elinaikojen perusteella γ -muotoon. Etanolilla aikaansaadussa nopeassa kiteytymisessä indometasiinin havaittiin kiteytyvän kuitenkin α -muotoon. Kiteytymisen eteneminen nähtiin tässäkin tapauksessa elinaikojen ja elinaikojen suhteellisten osuuksien muutoksena, mutta koska näissäkin FLM-kuvissa erottui selvästi kahta erilaista elinaikaa, kiteytymisen kinetiikkaa ei voitu tarkastella elinaikojen suhteellisten osuuksien muutoksesta. Sen sijaan, koska näytettä ei jouduttu siirtämään mittausten välillä, FLM-kuvien intensiteetit olivat keskenään verrannollisia ja kiteytymisen etenemistä voitiin tarkastella elinaikajakauman muutoksen kautta. Elinaikajakaumien perusteella ei voitu kuitenkaan määrittää kiteytymisen alku- ja loppuhetkeä, joten kineettinen tarkaste-

lu ei varsinaisesti kuvaa kiteytymisen mekanisme. Tulosten perusteella kiteytymisen seuraaminen elinaikajakauman avulla on kuitenkin mahdollista, jos FLM-kuvien intensiteetit ovat keskenään verrannollisia ja kiteytymiselle voidaan määrittää alku- ja loppuhetki. Menetelmä vaikuttaa lupaavalta erityisesti, koska kiteytymistä voidaan tarkastella elinaikajakaumien avulla myös tilanteissa, joissa FLM-kuvissa esiintyy useaa eri elinaikaa. Menetelmä vaatii kuitenkin vielä jatkoselvitystä kiteytymisen alku- ja loppuhetkien määrittämisestä. Toistettaessa seuranta pitäisi pyrkiä toteuttamaan siten, että kiteytymistä voidaan seurata myös elinaikojen osuuksien muutoksen avulla, jolloin menetelmien tuloksia voidaan verrata keskenään.

Tulosten perusteella elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia soveltuu kiteytymisen seuraamiseen näytteille, joissa kiteytyminen tapahtuu näytteen pinnalla tasanaisena kerroksena ja elinaikasovitus voidaan tehdä koko kuvan alueelle, eli FLM-kuvissa ei erotu useita, toisistaan reilusti poikkeavia elinaikoja. Menetelmä soveltuu parhaiten sileäpintaisille, yhtenäisille näytteille, jotka voidaan kiinnittää mikroskooppilasiin. Sen sijaan toisistaan selvästi erillisinä alueina kiteytyvien, jauhe- maisten tai muuten hyvin epätasaisten näytteen seurantaan menetelmä soveltuu huonosti.

LÄHTEET

- [1] R. Panakanti and A. S. Narang, “Impact of excipient interactions on drug bio-availability from solid dosage forms,” *Pharmaceutical Research*, vol. 29, no. 10, pp. 2639–2659, 2012.
- [2] L. Yu, “Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 48, pp. 27–42, 2001.
- [3] K. J. Crowley and G. Zografi, “The effect of low concentrations of molecularly dispersed poly(vinylpyrrolidone) on indomethacin crystallization from the amorphous state,” *Pharmaceutical Research*, vol. 20, no. 9, pp. 1417–1422, 2003.
- [4] A. G. Schmidt, S. Wartewig, and K. M. Picker, “Polyethylene oxides: protection potential against polymorphic transitions of drugs?,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 35, no. 5, pp. 360–367, 2004.
- [5] T. Wu, Y. Sun, N. Li, M. M. de Villiers, and L. Yu, “Inhibiting surface crystallization of amorphous indomethacin by nanocoating,” *Langmuir*, vol. 23, no. 9, pp. 5148–5153, 2007. PMID: 17397203.
- [6] M. Frenette, G. Cosa, and T. Friscic, “Characterisation of organic solid forms and real-time in situ monitoring of their transformations using solid-state fluorescence,” *CrystEngComm*, vol. 15, pp. 5100–5106, 2013.
- [7] M. Y. Berezin and S. Achilefu, “Fluorescence lifetime measurements and biological imaging,” *Chemical Reviews*, vol. 110, no. 5, pp. 2641–2684, 2010. PMID: 20356094.
- [8] R. Niesner and K.-H. Gericke, “Fluorescence lifetime imaging in biosciences: technologies and applications,” *Frontiers of Physics in China*, vol. 3, no. 1, pp. 88–104, 2008.
- [9] Z. Zhuo, X. Wu, and J. Yang, “Three-dimensional covalently linked allotropic structures of phosphorus,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 120, no. 46, pp. 26453–26458, 2016.
- [10] Z. A. Matysina, D. V. Schur, S. Yu. Zaginaichenko, V. B. Molodkin, and A. P. Shpak, *Phase Transformations in Carbon Materials*, pp. 1–24. Dordrecht: Springer Netherlands, 2005.
- [11] A. T. Florence and D. Attwood, *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Padstow, Cornwall: Pharmaceutical Press, 4th ed., 2006.

- [12] P. Gabbot and T. Mann, *Differential Scanning Calorimetry*. Royal Society of Chemistry, 2016.
- [13] J. Christian, “The classical theory of nucleation,” in *The Theory of Transformations in Metals and Alloys* (J. Christian, ed.), pp. 422–479, Oxford: Pergamon, 2002.
- [14] M. Castro, A. Sánchez, and F. Domínguez-Adame, “Lattice model for kinetics and grain-size distribution in crystallization,” *Phys. Rev. B*, vol. 61, pp. 6579–6586, 2000.
- [15] P. Karmwar, K. Graeser, K. C. Gordon, C. J. Strachan, and T. Rades, “Investigation of properties and recrystallisation behaviour of amorphous indomethacin samples prepared by different methods,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 417, no. 1–2, pp. 94–100, 2011.
- [16] M. Savolainen, A. Heinz, C. Strachan, K. C. Gordon, J. Yliruusi, T. Rades, and N. Sandler, “Screening for differences in the amorphous state of indomethacin using multivariate visualization,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 30, no. 2, pp. 113–123, 2007.
- [17] J. P. Botker, P. Karmwar, C. J. Strachan, C. Cornett, F. Tian, Z. Zujovic, J. Rantanen, and T. Rades, “Assessment of crystalline disorder in cryo-milled samples of indomethacin using atomic pair-wise distribution functions,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 417, no. 1–2, pp. 112–119, 2011.
- [18] K. J. Crowley and G. Zografi, “Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: Assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 91, no. 2, pp. 492–507, 2002.
- [19] K. Greco and R. Bogner, “Crystallization of amorphous indomethacin during dissolution: Effect of processing and annealing,” *Molecular Pharmaceutics*, vol. 7, no. 5, pp. 1406–1418, 2010. PMID: 20459092.
- [20] M. Soustelle, *Phase Transformations*. John Wiley & Sons, Incorporated, 1st ed., 2016.
- [21] W. Steurer, “Crystal structure of the metallic elements,” in *Physical Metallurgy* (R. W. Cahn and P. Haasen, eds.), ch. 1, pp. 1–46, Oxford: North-Holland, 4th, revised and enhanced ed., 1996.
- [22] J. Christian, “General introduction,” in *The Theory of Transformations in Metals and Alloys* (J. Christian, ed.), pp. 1–22, Oxford: Pergamon, 2002.

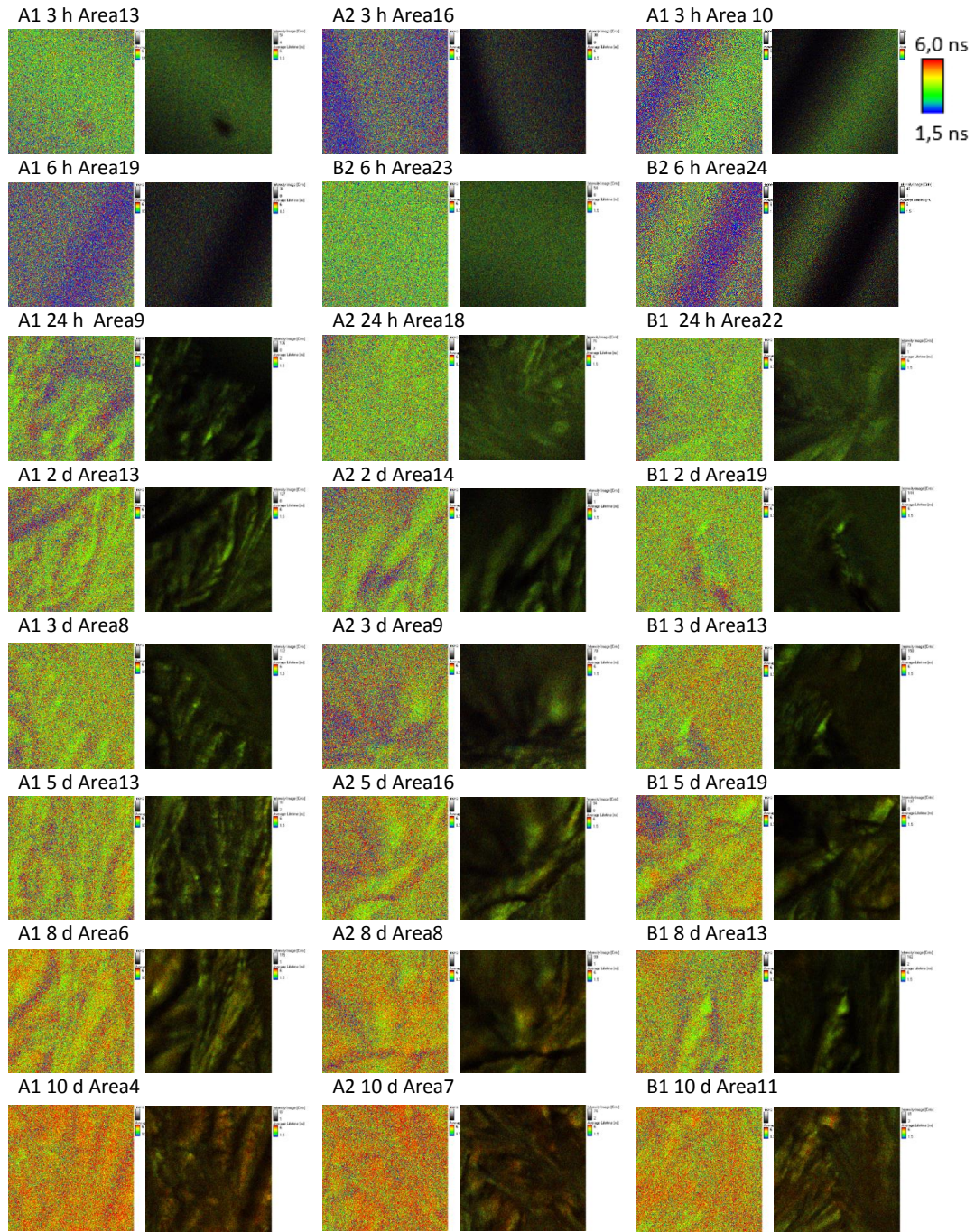
- [23] V. Andronis, M. Yoshioka, and G. Zografi, “Effects of sorbed water on the crystallization of indomethacin from the amorphous state,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 86, no. 3, pp. 346–351, 1997.
- [24] V. Andronis and G. Zografi, “Crystal nucleation and growth of indomethacin polymorphs from the amorphous state,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 271, no. 3, pp. 236–248, 2000.
- [25] A. Khawam and D. R. Flanagan, “Solid-state kinetic models: Basics and mathematical fundamentals,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 35, pp. 17315–17328, 2006. PMID: 16942065.
- [26] T. Engel and P. Reid, *Physical Chemistry*. Pearson Education, Inc., 2nd ed., 2010.
- [27] V. Rangelova and T. Spassov, “Primary crystallization kinetics in rapidly quenched Mg-based Mg–Ni–Y alloys,” *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 345, no. 1–2, pp. 148–154, 2002.
- [28] H. S. Fogler, *Elements of Chemical Reaction Engineering*. New Jersey: Prentice Hall International, Inc., 3rd ed., 1999.
- [29] S. Rohilla, S. Kumar, P. Aghamkar, S. Sunder, and A. Agarwal, “Investigations on structural and magnetic properties of cobalt ferrite/silica nanocomposites prepared by the coprecipitation method,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 323, no. 7, pp. 897–902, 2011.
- [30] H. Imaizumi, N. Nambu, and T. Nagai, “Stability and several physical properties of amorphous and crystalline forms of indomethacin,” *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 28, no. 9, pp. 2565–2569, 1980.
- [31] N. Chieng, J. Aaltonen, D. Saville, and T. Rades, “Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 71, no. 1, pp. 47–54, 2009. Special Issue: Solid State and Solid Dosage Forms.
- [32] L. S. Taylor and G. Zografi, “The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy,” *Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 5, pp. 755–761, 1998.
- [33] P. T. Mah, T. Laaksonen, T. Rades, L. Peltonen, and C. J. Strachan, “Differential scanning calorimetry predicts the critical quality attributes of amorphous

- glibenclamide,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 80, pp. 74–81, 2015.
- [34] N. Chieng, T. Rades, and D. Saville, “Formation and physical stability of the amorphous phase of ranitidine hydrochloride polymorphs prepared by cryo-milling,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 68, no. 3, pp. 771–780, 2008.
- [35] A. Hédoux, L. Paccou, Y. Guinet, J.-F. Willart, and M. Descamps, “Using the low-frequency Raman spectroscopy to analyze the crystallization of amorphous indomethacin,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 38, no. 2, pp. 156–164, 2009.
- [36] T. Rojalin, L. Kurki, T. Laaksonen, T. Viitala, J. Kostamovaara, K. C. Gordon, L. Galvis, S. Wachsmann-Hogiu, C. J. Strachan, and M. Yliperttula, “Fluorescence-suppressed time-resolved Raman spectroscopy of pharmaceuticals using complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) single-photon avalanche diode (SPAD) detector,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, no. 3, pp. 761–774, 2016.
- [37] B. Wardle, *Principles and Applications of Photochemistry*. John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken, GB., 2009.
- [38] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- [39] J. R. Lakowicz, ed., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006.
- [40] S. A. Surwase, J. P. Boetker, D. Saville, B. J. Boyd, K. C. Gordon, L. Peltonen, and C. J. Strachan, “Indomethacin: New polymorphs of an old drug,” *Molecular Pharmaceutics*, vol. 10, no. 12, pp. 4472–4480, 2013. PMID: 24025118.
- [41] B. Hinz, C. P. Dorn, T. Y. Shen, and K. Brune, “Anti-inflammatory–antirheumatic drugs,” in *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- [42] W. Niensted, O. Hänninen, A. Arstila, and S.-E. Björkqvist, *Ihmisen fysiologia ja anatomia*. Porvoo: WSOY, 6th ed., 1989.
- [43] S. B. Murdande, M. J. Pikal, R. M. Shanker, and R. H. Bogner, “Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: I. a thermodynamic analysis,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 99, no. 3, pp. 1254–1264, 2010.

- [44] S. Lohani, I. V. Nesmelova, R. Suryanarayanan, and D. J. Grant, "Spectroscopic characterization of molecular aggregates in solutions: Impact on crystallization of indomethacin polymorphs from acetonitrile and ethanol," *Crystal Growth & Design*, vol. 11, no. 6, pp. 2368–2378, 2011.
- [45] S.-Y. Lin, H.-L. Lin, Y.-T. Chi, Y.-T. Huang, C.-Y. Kao, and W.-H. Hsieh, "Thermoanalytical and fourier transform infrared spectral curve-fitting techniques used to investigate the amorphous indomethacin formation and its physical stability in indomethacin-soluplus® solid dispersions," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 496, no. 2, pp. 457–465, 2015.
- [46] X. Pan, T. Julian, and L. Augsburger, "Increasing the dissolution rate of a low-solubility drug through a crystalline-amorphous transition: A case study with indomethacin," *Drug Development & Industrial Pharmacy*, vol. 34, no. 2, pp. 221–231, 2008.
- [47] B. W. Disanayaka and A. C. Weedon, "Charge transfer fluorescence of some n-benzoylindoles," *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 65, no. 2, pp. 245–250, 1987.
- [48] A. C. Weedon and D. F. Wong, "The photochemistry of indomethacin," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 61, no. 1, pp. 27–33, 1991.
- [49] A. Ghatak, P. C. Mandal, and M. Sarkar, "Indomethacin: A NSAID sensitive to micro heterogeneity in alcohol-water mixtures," *Chemical Physics Letters*, vol. 460, no. 4–6, pp. 521–524, 2008.
- [50] Y. Sun, L. Zhu, K. L. Kearns, M. D. Ediger, and L. Yu, "Glasses crystallize rapidly at free surfaces by growing crystals upward," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 15, pp. 5990–5995, 2011.
- [51] M. Hasebe, D. Musumeci, C. T. Powell, T. Cai, E. Gunn, L. Zhu, and L. Yu, "Fast surface crystal growth on molecular glasses and its termination by the onset of fluidity," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 27, pp. 7638–7646, 2014. PMID: 24922278.
- [52] Y. Sun, H. Xi, S. Chen, M. D. Ediger, and L. Yu, "Crystallization near glass transition: Transition from diffusion-controlled to diffusionless crystal growth studied with seven polymorphs," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 18, pp. 5594–5601, 2008. PMID: 18407712.

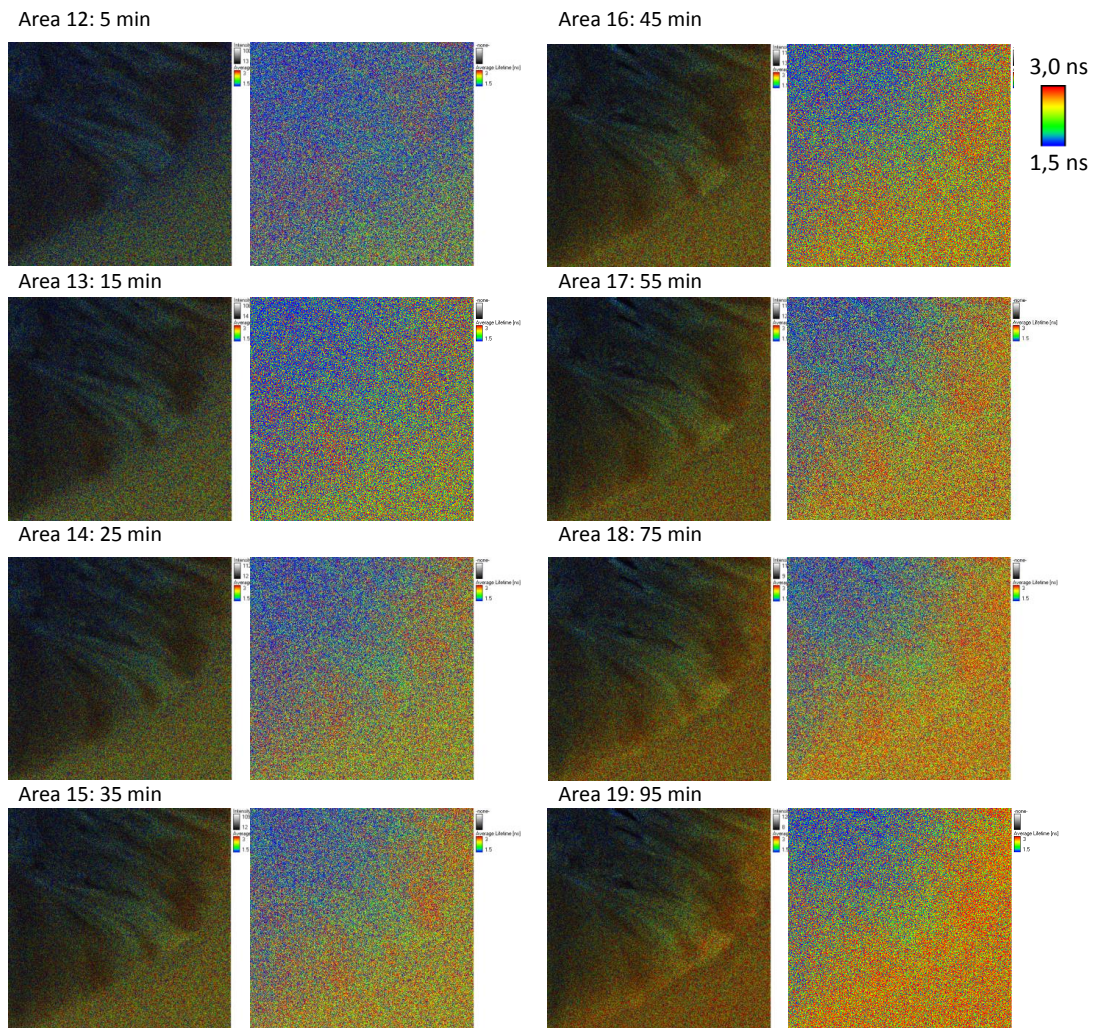
- [53] N. Kaneniwa, M. Otsuka, and T. Hayashi, “Physicochemical characterization of indomethacin polymorphs and the transformation kinetics in ethanol,” *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 33, no. 8, pp. 3447–3455, 1985.
- [54] HORIBA Instruments Incorporated, “Fluorolog-3 with FluorEssence,” operation manual, Jobin Yvon Technology, HORIBA Scientific, 2014.
- [55] PicoQuant, “Microtime 200 fluorescence lifetime microscope,” user’s manual and technical data, PicoQuant GmbH. Part I. Hardware, version 4.2.
- [56] M. Wahl and S. Orthaus-Müller, “Time tagged time-resolved fluorescence data collection in life sciences,” technical note, PicoQuant GmbH, 2014.

LIITE 1.



Kuva 1 FLM-kuvaparit (ilman intensiteettimodulointia vasemmalla, intensiteettimoduloitu oikealla) lämpökaapissa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa $0\text{ }\%$ RH:ssä säilytetyistä näytteistä säilytyksen eri vaiheissa. FLM-kuvaparin yläpuolella on näytteen numero, ikä ja FLM-kuvan tunniste. Kaikki kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on otettu 40-kertaisesti suurentavalla ilmaobjektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405\text{ nm}$ ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900\text{ nm}$. Kuvien koko on $80 \times 80\text{ }\mu\text{m}$ ja resoluutio $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

LIITE 2.



Kuva 2 FLM-kuvaparit (intensiteettimoduloitu vasemmalla, ilman intensiteettimodulointia oikealla) etanolilla aiheutetusta kiteymisestä kiteytymisen edetessä. FLM-kuvaparin yläpuolella on FLM-kuvan tunniste ja aika, joka on kulunut kiteytymisen käynnistämisestä. Kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla, ja ne on otettu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersion-objektiivilla aallonpituuksilla $\lambda_{ex} = 405$ nm ja $\lambda_{mon} = 430\text{--}900$ nm. Kuvien koko on $50 \times 50 \mu\text{m}$ ja resoluutio $0,1 \mu\text{m}$.